

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANE CATARINE TOSI COSTA

Resposta a estresses consecutivos em
Saccharomyces cerevisiae

VITÓRIA-ES

2017

ANE CATARINE TOSI COSTA

Resposta a estresses consecutivos em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Patricia Machado Bueno Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes

VITÓRIA-ES

2017

ANE CATARINE TOSI COSTA

Resposta a estresses consecutivos em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 09 de março de 2017

Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo

VITÓRIA-ES
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Resposta a Estresses Consecutivos em *Saccharomyces cerevisiae*"

Ane Catarine Tosi Costa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Profª. Drª. Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Orientadora

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes (UFES)
Coorientador

Prof. Dr. José Aires Ventura (UFES)
Membro Interno

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (UFES)
Membro Externo

Vitória-ES, 09 de Março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo por ter disponibilizado a infraestrutura e recursos necessários para a elaboração e concretização desse trabalho.

Agradeço aos meus orientadores Profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes e Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes por todas as oportunidades concedidas através do Mestrado que mudaram completamente a minha vida e a minha visão sobre a Ciência. Serei sempre grata pelo acolhimento e pelos conselhos de todos do grupo do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA).

A todos os amigos do LBAA, em especial a Raissa e Lauanda por estarem comigo desde o princípio dessa aventura. Obrigada à Fernanda Bravim e Olga, pela paciência e por me mostrarem esse mundo microscópico maravilhoso. Ao Tarcio e Luiza por me fazerem companhia no momento mais necessário do desenvolvimento do meu projeto. À Jefferson, Rogério e Joseline pelo ombro amigo. À Marlonni, Aline, Oeber, Barbara, Fernanda Peron, Poliana, Lara, Johana, Tatiana, Michi, Maurício, Ana, Brígida, Luiza Favarato pela companhia no dia a dia.

Aos professores Dr. Alexandre Martins Costa Santos, e Dr. José Aires Ventura pela correção do trabalho e por participarem da banca.

Aos meus pais, Clenilton e Raeth, que são a base fundamental da minha vida, e que continuamente de deram forças para continuar nessa jornada que muitas vezes não foi fácil. Aos meus irmãos Raíssa e Luis Gustavo, pela amizade e por sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado Marcelo, que foi fundamental para a conquista desse título. Obrigada por sempre me incentivar a dar o meu melhor.

Aos meus Tios Zezo, Simone, Rita e Penha, por todo apoio nesses dois anos de muito estudo e trabalho.

Aos meus amigos pessoais, em especial ao Carlos, Érika, Rísia por me escutarem e dividirem minhas mágoas e vitórias durante todo esse tempo.

E às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPES e FINEP pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigada.

Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças.

Leon C. Megginson

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* desempenha um papel importante na indústria, devido a sua alta capacidade fermentativa. Durante a fermentação há mudanças constantes nas condições do meio, expondo as leveduras a uma série de estresses simultâneos ou sequenciais e uma adaptação eficiente pode levar a aumento da produtividade e um consequente aperfeiçoamento do seu desempenho fermentativo. Em *S. cerevisiae*, a adaptação envolve uma mobilização organizada de genes denominada resposta ao estresse ambiental (ESR). Hsp12 é uma proteína pertencente a famílias das proteínas de choque térmico (HSPs) e esta, além de manter a organização interna da célula e aumentar a flexibilidade da parede celular e membrana plasmática, é utilizada como gene repórter de estresse, pois sua indução é em grande parte através da ESR já sendo utilizada como um marcador do status de estresse em leveduras. Assim o presente trabalho delineou um protocolo de estudos de estresses consecutivos afim de avaliar modificações morfológicas e produção da proteína Hsp12 em *S.cerevisiae*. Os resultados mostraram uma variação semelhante de tamanho das células-mães e filhas nos estresses sucessivos comparada ao crescimento dessas células em meio sem adição de estresses. A parada no ciclo celular também foi uma característica observada em ambas as células em estresses consecutivos. A produção de Hsp12 foi maior em resposta ao estresse osmótico comparado aos estresses oxidativo e alcoólico nos tratamentos isolados, mas a concentração desta proteína nos dois últimos foi aumentada quando a célula foi exposta aos estresses consecutivos. Esse aumento pode ser justificado pela proteção cruzada da célula adquirida após o contato com uma solução com alta osmolaridade. A diferença nos resultados da resposta a estresses isolados e sucessivos constata que esta metodologia é mais eficaz para entender o comportamento da célula, pois se assemelha ao ambiente nas dornas de fermentação.

Palavras-chave: Hsp12, estresses consecutivos, proteção cruzada, Tolerância a estresse, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* yeast plays an important role in industry due to its high fermentative capacity. During fermentation, there are constant changes in the conditions of the medium, exposing the yeasts to a series of simultaneous or sequential stresses and an efficient adaptation can lead to increased productivity and a improvement of their fermentative performance. In *S. cerevisiae*, adaptation involves an organized mobilization of genes called environmental stress response (ESR). Hsp12 is a protein belonging to families of heat shock proteins (HSPs) and this, in addition to maintaining the internal organization of the cell and increasing the flexibility of the cell wall and plasma membrane, is used as a stress reporter gene because its induction is in Largely through ESR already being used as a marker of stress status in yeast. Thus, the present work outlined a protocol of consecutive stress studies in order to evaluate morphological modifications and production of Hsp12 protein in *S.cerevisiae*. The results showed a similar variation of size of the mother cells and daughters in successive stresses compared to the growth of these cells in medium without stress addition. Cell cycle arrest was also a characteristic observed in both cells in consecutive stresses. The production of Hsp12 was higher in response to osmotic stress compared to oxidative and alcoholic stress in the isolated treatments, but the concentration of this protein in the latter two increased when the cell was exposed to consecutive stresses. This increase may be justified by the cross-protection of the acquired cell after contact with a high osmolarity solution. The difference in the results of the response to isolated and successive stresses shows that this methodology is more efficient to understand the behavior of the cell, because it is similar to the environment in the fermentation tanks.

Key words: Hsp12, consecutive stresses, cross-protection, Stress tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> através de Microscopia Eletrônica. A) e B) Corte de microscopia de transmissão mostrando diversas organelas da levedura: CM: Membrana plasmática; N: Núcleo; ER: Retículo Endoplasmático; M: Mitocôndria; CW: Parede celular; V: Vacúolo; NM: Membrana Nuclear. C) Imagem de microscopia de Varredura mostrando a parede celular da levedura, BS: Cicatriz de nascimento...	14
Figura 2 - Tipos de estresses durante o processo de fermentação da cerveja.	17
Figura 3 - Representação das condições de estresses mais frequentes e mais estudadas e os fatores de transcrição mais relevantes envolvidos no controle da expressão de genes de resposta a estresse em <i>S.cerevisiae</i>	19
Figura 4 - Características básicas da resposta a estresse osmótico em <i>S. cerevisiae</i>	21
Figura 5 - A região promotora de <i>HSP12</i> contém 11 elementos responsivos a estresse já conhecidos entre a posição -700 e +1pb.	26
Figura 6 - Método para aplicação dos estresses isolados em leveduras na fase exponencial de crescimento.	29
Figura 7 - Método para aplicação dos estresses consecutivos em leveduras na fase exponencial de crescimento.	30
Figura 8 - Método para construção de gráficos de barras a partir dos histogramas do citômetro de fluxo. Os histogramas são feitos a partir da obtenção da fluorescência de 20.000 células e os gráficos de barras foram construídos a partir da mediana dos histogramas. A) Histogramas de fluorescência em diferentes tempos, B) Dados estatísticos de 20.000 eventos, C) Gráficos de barras confeccionadas com as medianas dos histogramas.	31
Figura 9 - Configuração da placa Y04C do CellAsic. A placa possui 4 unidades independentes (A-D), cada uma possui 6 poços de entrada (1-6), um poço para as células (8) e um grande poço de descarte (7)..	33
Figura 10 - Representação do diâmetro maior e menor em leveduras.	34
Figura 11 - Sobrevivência das leveduras <i>S.cerevisiae</i> após 90 minutos submetidas à estresses fermentativos. A) Controle-YEPD, B) Estresse Osmótico - 1M de Sorbitol, C) Estresse Oxidativo – 0,6mM de H ₂ O ₂ , D) Estresse Alcoólico - 8% Etanol (v/v).....	35

Figura 12 - Variação do tamanho de leveduras durante 270 minutos em meio rico (YEPD líquido) sem adição de estresses. A cada 15 minutos foi aferido o tamanho das células jovens e adultas. A linha de variação representa o padrão de uma mesma célula ao longo do tempo.....37

Figura 13 - Variação do tamanho da levedura *S. cerevisiae* durante 270 minutos submetida a estresses fermentativos. Inicialmente as células foram submetidas ao estresse osmótico (1M Sorbitol), em seguida ao estresse oxidativo (0,6mM de H₂O₂) e, por fim, ao estresse alcoólico (8%ETOH). A cada 15 minutos foi aferido o tamanho das células jovens e adultas. A linha de variação representa o padrão de uma mesma célula ao longo do tempo.38

Figura 14 - Produção de Hsp12 em uma mesma célula durante estresses consecutivos. A célula foi submetida a 90 minutos de estresse osmótico e a 30 minutos de estresse oxidativo de forma consecutiva. A objetiva utilizada para visualização das células foi de 100x.41

Figura 15 - Variação da proteína Hsp12 durante estresses isolados. Foi quantificado, por fluorescência, a proteína Hsp12 durante 90 min de experimento, através da citometria de fluxo. A cada 15 minutos era retirada uma alíquota, para análise da variação dos níveis da proteína. A) Experimento Controle (células crescidas em YEPD), B) Estresse Osmótico, C) Estresse Oxidativo, D) Estresse Alcoólico.42

Figura 16 - Variação da proteína Hsp12 durante estresses consecutivos. Foi quantificado, por fluorescência, a proteína Hsp12 durante 270 min de experimento, através da citometria de fluxo. A cada 15 minutos era retirada uma alíquota, para análise da variação dos níveis da proteína. A sequência escolhida dos estresses foi: Estresse Osmótico, Estresse Oxidativo e Estresse Alcoólico.....44

LISTA DE SIGLAS

ESR	Resposta ao estresse ambiental (do inglês <i>Environmental Stress Response</i>)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>)
HOG	Via do glicerol de alta osmolaridade (do inglês <i>High Osmolarity Glycerol</i>)
HSPs	Proteínas de Choque térmico (do inglês <i>Heat Shock Proteins</i>)
iESR	Genes induzidos pela Resposta ao estresse ambiental (do inglês <i>Genes induced by environmental stress response</i>)
MAPK	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos (do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
PI	Iodeto de Propídio (do inglês <i>Propidium Iodide</i>)
PKA	Proteína Quinase A (do inglês <i>Protein Kinase A</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
STRE	Elemento Responsivo ao Estresse (do inglês <i>Stress Response Element</i>)
YEPD	Extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.2 Fermentação alcoólica	16
1.3 Resposta celular ao estresse	17
1.3.1 Estresse Osmótico	20
1.3.2 Estresse Oxidativo	22
1.3.3 Estresse Alcoólico	23
1.4 HSPs	23
1.5 A importância da proteína Hsp12	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos:	27
3.0 MATERIAI E MÉTODOS	28
3.1 Cepa de levedura e condições de crescimento	28
3.2 TRATAMENTOS	28
3.2.1 Estresses isolados	28
3.2.2 Estresse Consecutivos	29
3.3 Citometria de Fluxo	30
3.3.1 Viabilidade Celular	31
3.3.2 Análise da expressão de <i>HSP12-GFP</i>	32
3.4 CellAsic	32
3.5 Microscópio de Fluorescência e NIS ELEMENTS	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Sobrevivência aos estresses fermentativos	35
4.2 Variação do tamanho das células em YEPD	36
4.3- Variação do tamanho das células durante estresses consecutivos	38
4.4 Localização subcelular de <i>HSP12-GFP</i> durante estresses consecutivos	40
4.5 Avaliação da produção da proteína Hsp12	41
4.5.1 Produção de <i>HSP12-GFP</i> durante estresses isolados	41
4.5.2 Produção de <i>HSP12-GFP</i> durante estresses consecutivos	44
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular bem definida. Esses microrganismos pertencem, em sua maioria, ao grupo dos ascomicetos e uma das suas características é a grande heterogeneidade quanto ao tamanho celular, forma, cor e divisão celular, havendo grandes diferenças mesmo em indivíduos da mesma linhagem. Essas mudanças são decorrentes da sensibilidade destas, frente a mudanças nas condições ambientais (FERNANDES, 2009).

A levedura *S. cerevisiae* pertence à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoidea, que abrange 26 gêneros. Os organismos incluídos no gênero *Saccharomyces* são, em sua maioria, fungos unicelulares diploides e possuem outras peculiaridades em comum: por exemplo, todas as espécies possuem alta capacidade fermentativa, se dividem por gemulação, ou brotamento, não possuem hifas verdadeiras (pseudo-hifas podem estar presentes) e possuem ascósporos elipsoidais, que não são liberados na reprodução podendo germinar e conjugar dentro do asco. As células de *S. cerevisiae* apresentam um formato elipsoidal, e variam de tamanho entre 5-10 µm no diâmetro maior e em 1-7 µm no diâmetro menor (Figura 1) (FERNANDES, 2009; KREGER-VAN, 1987).

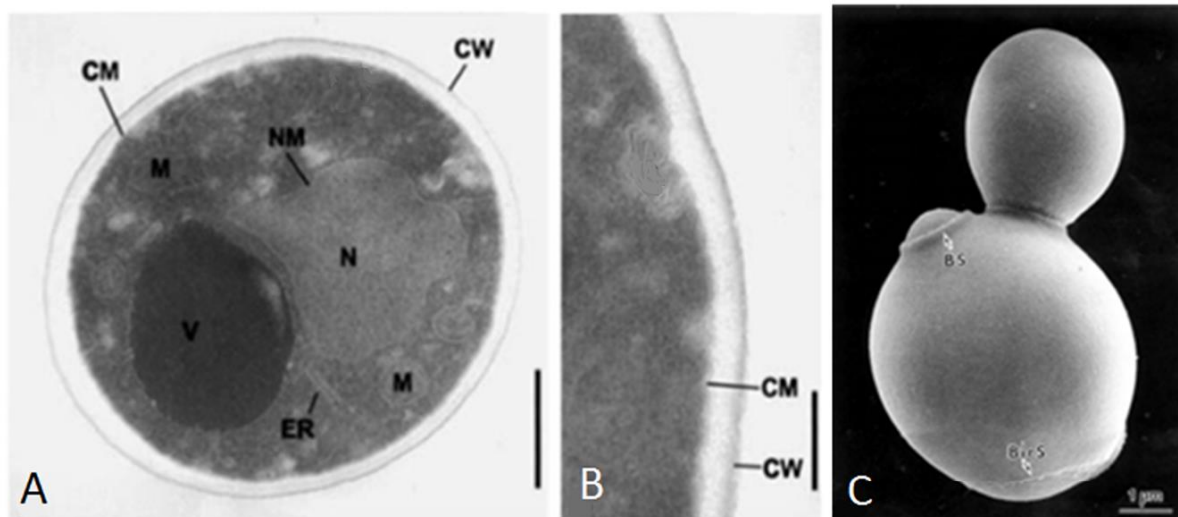


Figura 1 - Imagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através de Microscopia Eletrônica. A) e B) Corte de microscopia de transmissão mostrando diversas organelas da levedura: CM: Membrana plasmática; N: Núcleo; ER: Retículo Endoplasmático; M: Mitocôndria; CW: Parede celular; V: Vacúolo; NM: Membrana Nuclear. C) Imagem de microscopia de Varredura mostrando a parede celular da levedura, BS: Cicatriz de nascimento. Fontes: FERNANDES; FARINA; KURTENBACH, 2001; OSUMI, 2012.

A levedura *S. cerevisiae* se divide assexuadamente por gemulação ou brotamento, processo no qual a nova célula se forma como uma pequena gêmula ou broto na célula mãe, crescendo até separar-se dela. Após a divisão celular, a célula filha deixa na mãe uma cicatriz de nascimento. O número de cicatrizes de gemas presentes na parede celular representa o número de vezes que a célula se dividiu (FERNANDES, 2009).

Outra característica importante de *S. cerevisiae* é que são anaeróbicas facultativas, demonstrando metabolismo tanto respiratório quanto fermentativo. No entanto, o metabolismo fermentativo predomina sobre o respiratório quando as concentrações de açúcares estão elevadas, mesmo sob condições aeróbicas. Esse comportamento metabólico é provocado por um efeito conhecido como repressão catabólica, sendo que as altas concentrações de glicose inibem a expressão de genes envolvidos na via respiratória, fazendo com que o piruvato seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (TREVISOL et al., 2011).

Essa levedura se tornou um dos organismos-chave para a pesquisa genômica, principalmente após ter sido o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). Seu genoma é facilmente manipulável e ainda

que seja mais complexo que bactérias, esse microrganismo compartilha muitas vantagens técnicas que permitiram um rápido progresso na genética molecular. Algumas de suas particularidades são o rápido crescimento, células dispersas, a facilidade de plaqueamento de réplicas e isolamento de mutantes, um sistema genético bem definido e um sistema de transformação altamente versátil (GIETZ; WOODA, 2002).

O desenvolvimento das técnicas de transformação de DNA tornou a levedura particularmente acessível à clonagem de genes e técnicas da engenharia genética. Os plasmídeos podem ser introduzidos em suas células como moléculas replicantes ou podem se integrar ao seu genoma. Em leveduras, a integração de DNA transformante no genoma procede exclusivamente por recombinação homóloga (F SHERMAN, 2002). Os avanços dessas técnicas possibilitaram a construção de diversas linhagens comerciais, principalmente, através da expressão heteróloga de genes ou pela modificação ao nível de expressão gênica (superexpressão ou deleção).

S. cerevisiae desempenha um papel importante na indústria, devido à sua excelente capacidade para produzir etanol e dióxido de carbono a partir de açúcares com alta produtividade, titulação e produção. Panificação, produção de vinho, cerveja e produção de álcool combustível (etanol) são produtos da utilização da levedura na indústria biotecnológica. Uma das características que leva a sua grande utilização pela indústria é devido a sua adaptabilidade às alterações ambientais, ajustando rapidamente seu metabolismo para lidar com variações e sua tolerância a baixos valores de pH, a alta concentração de açúcares e de etanol (NEVOIGT, 2008). Linhagens de *S. cerevisiae* selvagens são capazes de sobreviver e dominar dornas de fermentação alcoólicas, que são considerados ambientes inóspitos. Isso pode ser evidenciado porque durante a reciclagem de células, a pressão seletiva (evolução adaptativa) que as células sofrem, induz o aparecimento de características favoráveis para o processo fermentativo (BASSO et al., 2008).

1.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica se processa no citoplasma celular e a transformação do açúcar em etanol e CO₂ envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tanto as enzimas quanto a própria célula sofrem ações de diversos fatores (nutricionais, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros) afetando o desempenho do processo fermentativo (LIMA et al., 2001).

Durante a fermentação há uma alternância na presença desses fatores e diversas mudanças nas condições ambientais. Se essas condições ameaçam a sobrevivência da célula e impede que ela se desenvolva no seu potencial ótimo, elas são comumente referidas como estresses (GASH, 2003).

Na fabricação de cerveja, as leveduras estão envolvidas nas etapas de propagação, fermentação e estoque. Esses microrganismos são expostos a uma série de estresses, alguns simultâneos e outros sequenciais, e o surgimento destes na dorna de fermentação obedece a uma ordem cronológica.

No início da fermentação, as leveduras passam por condições de altas temperaturas, estresse hiperosmótico causado por altas concentrações de solutos, e estresse oxidativo devido à aerobiose. À medida que há uma progressão da fermentação, esses microrganismos são expostos à anaerobiose e um aumento da concentração de acetaldeído e etanol, acidificação e restrição nutricional (Figura 2) (SMART, 2007; VAN VOORST et al., 2006).

A presença de alguns estresses varia nos diferentes processos de produção de cachaça, vinho e etanol combustível, mas o requisito mais desejado nesses diversos ambientes industriais é a resistência da levedura à múltiplos estresses (ÇAKAR et al., 2005; RANDEZ-GIL; SANZ; PRIETO, 1999).

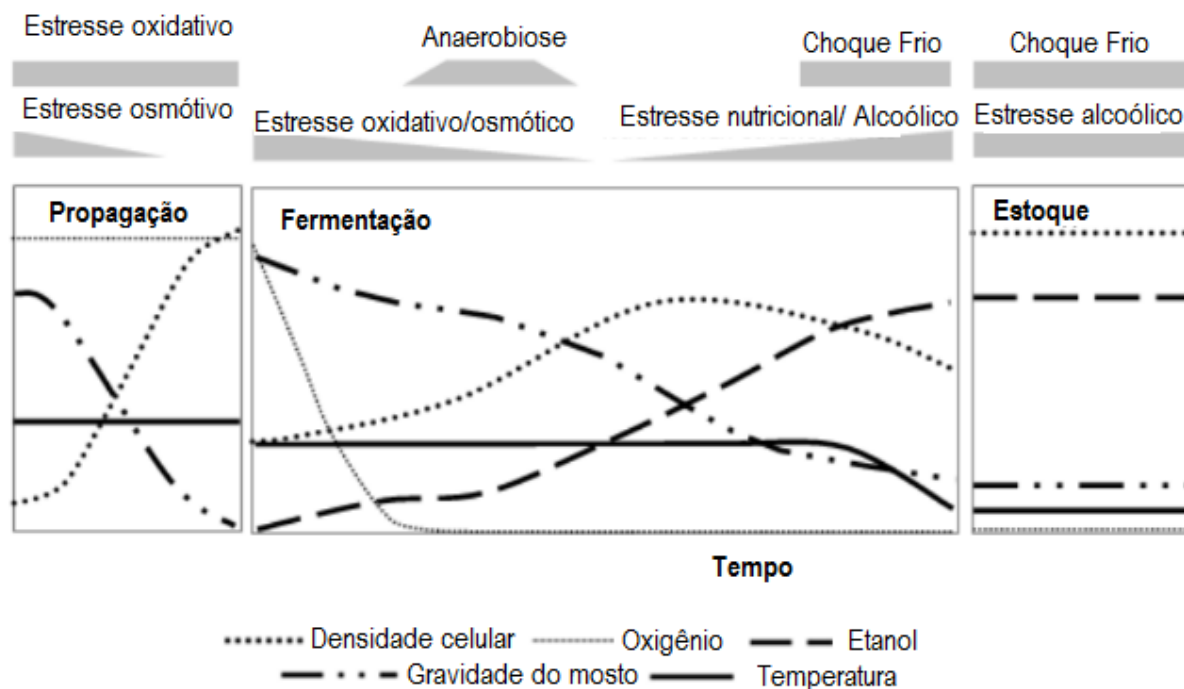


Figura 2 - Tipos de estresses durante o processo de fermentação de cerveja. Fonte: Modificado de BLEONCA; BAHRIM, 2013.

1.3 RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE

A resposta celular a estresse objetiva a proteção da célula aos efeitos prejudiciais do estresse e a possível reparação do dano. A aquisição de tolerância ao estresse revela que a levedura e outros microrganismos têm uma capacidade inerente para melhorar a sua resposta ao estresse, desde que os ativadores externos e / ou internos apropriados sejam ativados (HOHMANN; MAGER, 2003; STANLEY et al., 2010).

Leveduras podem se adaptar a ambientes estressantes através da antecipação, onde um organismo usa informações sobre seu ambiente atual para desencadear a expressão gênica e outras mudanças fisiológicas adaptativas em ambientes futuros (MITCHELL et al., 2008; TAGKOPOULOS; LIU; TAVAZOIE, 2008). E outros dois mecanismos podem estar envolvidos: resistência induzida e proteção cruzada.

Quando um organismo, na presença de um estresse, se adapta e desenvolve tolerância a doses altas desse mesmo estresse, essa resposta é denominada resistência induzida. Mas quando essa mesma resposta induz resistência a estresses causados por outros agentes, esse recurso é denominado proteção cruzada. Essas respostas sugerem que exista um mecanismo interativo capaz de detectar e responder a diferentes formas de estresse, que envolve funções celulares tais como proteção celular, metabolismo energético e produção de proteínas protetoras (HSPs) ou armazenamento de carboidratos (por exemplo, trealose). A produção de trealose e HSPs são algumas das respostas mais notáveis associadas à proteção cruzada (LEE; LEE, 2005; SOTO et al., 1999; TROTT; MORANO, 2003).

Um recurso que as células de levedura usam para proteger o sistema interno dos efeitos da variação ambiental é iniciar uma expressão coordenada de genes que geralmente protege a célula durante os momentos estressantes. Essa resposta, também conhecida como a resposta ao estresse ambiental - em inglês *environmental stress response* (ESR), inclui 900 genes cuja expressão é alterada quando as células de levedura são deslocadas para ambientes estressantes (GASH, 2003). Uma série de estudos identificou um elemento que possui sequência comum nas regiões promotoras dos genes induzidos por estresse. Esse elemento é referido como Elemento Responsivo ao Estresse (STRE), sugerindo fortemente que os genes são coregulados por um fator comum (KOBAYASHI; MCENTEE, 1990, 1993; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Uma busca no banco de dados do genoma de levedura identificou 186 genes contendo a sequência STRE em seu promotor. Em leveduras que se reproduzem por brotamento, genes como *CTT1*, *HSP12*, *GDP1* e *TPS2* possuem a sequência central de consenso AGGGG, que determina o STRE (ESTRUCH; CARLSON, 2001).

Os fatores de ligação à STRE são dois fatores de transcrição, do tipo dedo de zinco, denominados Msn2 e seu homólogo Msn4 (Figura 3) (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996; SCHMITT; MCENTEE, 1996).

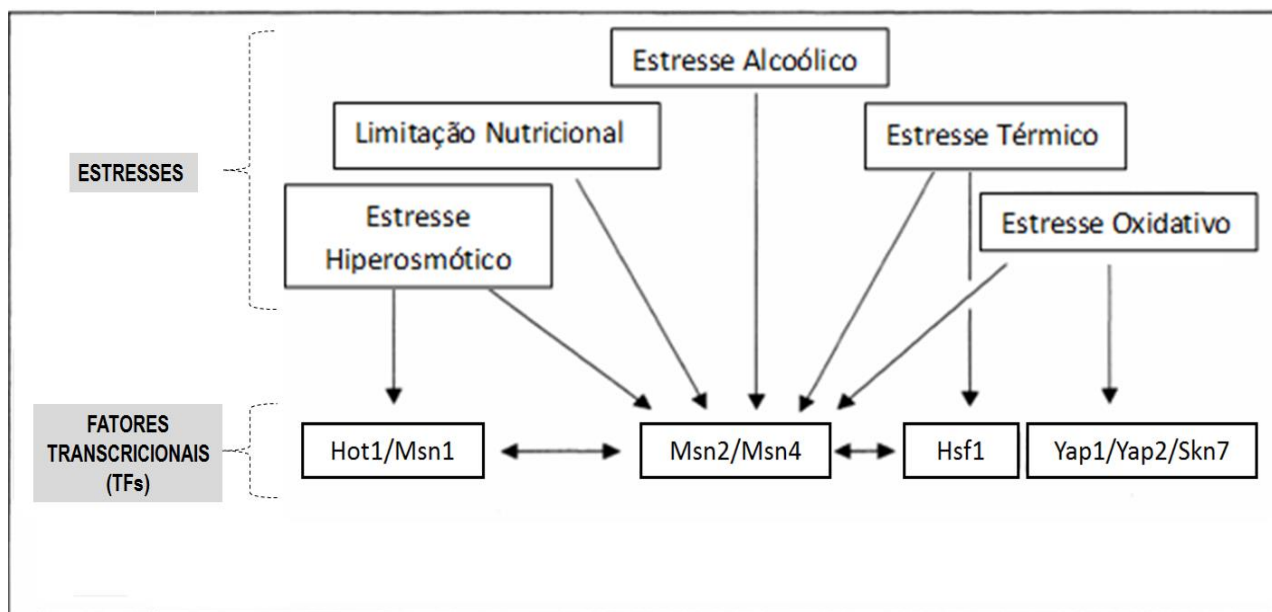


Figura 3 - Representação das condições de estresses mais frequentes e mais estudadas e os fatores de transcrição mais relevantes envolvidos no controle da expressão de genes de resposta a estresse em *S.cerevisiae*. Fonte: modificado de BAUER; PRETORIUS, 2000.

Quando a célula não está sob a influência de nenhum estresse, Msn2/4 estão localizados no citoplasma. No momento que a célula entra em contato com condições estressantes, estes são translocados para o núcleo onde se ligam ao STRE - na região promotora de inúmeros genes (HOHMANN; MAGER, 2003).

A migração desses fatores ao núcleo está relacionada à baixa atividade da proteína quinase A (PKA) dependente da presença de AMP cíclico (cAMP). Isso ocorre em consequência da diminuição dos níveis intracelulares de cAMP provocadas pela baixa taxa de crescimento, que é uma característica comum a células sob estresse ou carência nutricional (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996).

A ativação da resposta geral a estresse é um recurso comum de resposta a vários ambientes diferentes, mas a regulação da expressão dos genes é específica para cada estresse submetido à célula. Assim, a maquinaria de resposta é precisamente controlada a cada novo ambiente (GASH, 2003). Por esse motivo é de grande interesse dos pesquisadores identificar os estresses mais comuns e recorrentes nos ambientes fermentativos e investigar a resposta única da célula frente a eles. Três

estresses comumente encontrados na fermentação e que causam efeitos na estrutura celular e na sua viabilidade são os estresses osmótico, oxidativo e o alcoólico

1.3.1 Estresse Osmótico

A pressão osmótica é a força existente entre duas soluções de diferentes concentrações separadas por uma membrana semipermeável. Quando a levedura é exposta a mostos (líquido açucarado que pode ser fermentado), ela é submetida a uma pressão osmótica, e essa exposição desencadeia uma resposta da célula contra estresse. Em muitos processos fermentativos o estresse osmótico tem início logo no início da fermentação, diminuindo após a redução gradual dos açúcares no meio. Pressões osmóticas muito elevadas tais como as encontradas em dornas de fermentação, podem modificar o metabolismo da levedura ou diminuir a viabilidade da mesma (HEGGART et al., 1999).

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo osmotolerante e aerotolerante, o que significa que as células podem tolerar e se adaptar em meio nutricional com alta osmolaridade (NICOLAU; TORTOI, 2006). Alterações na disponibilidade de água e do volume celular causado por influxo/efluxo de água desencadeia mudanças estruturais nas células. Por exemplo, o citoesqueleto de actina é polarizado em células em crescimento, o que é essencial para o direcionamento apropriado das gêmulas na divisão celular e formação da projeção no acasalamento. Estresse osmótico assim como outros estresses causa rápida perda dos filamentos de actina da célula-mãe, perda de polaridade e parada no ciclo celular, além da prevista perda de água e encolhimento da célula (Figura 4). Durante a adaptação desta, os filamentos de actina são reestruturados, repolarizados e a célula volta a crescer (CHANT, 1999; TEUSINK et al., 1998).

Estresse osmótico também perturba a membrana plasmática em nível de estrutura, permeabilidade e propriedades mecânicas (TOLEDANO et al., 2003). Análises de expressão gênica global mostraram que a expressão de genes codificantes de

proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios é afetada em função do estresse osmótico (REP et al., 2000).

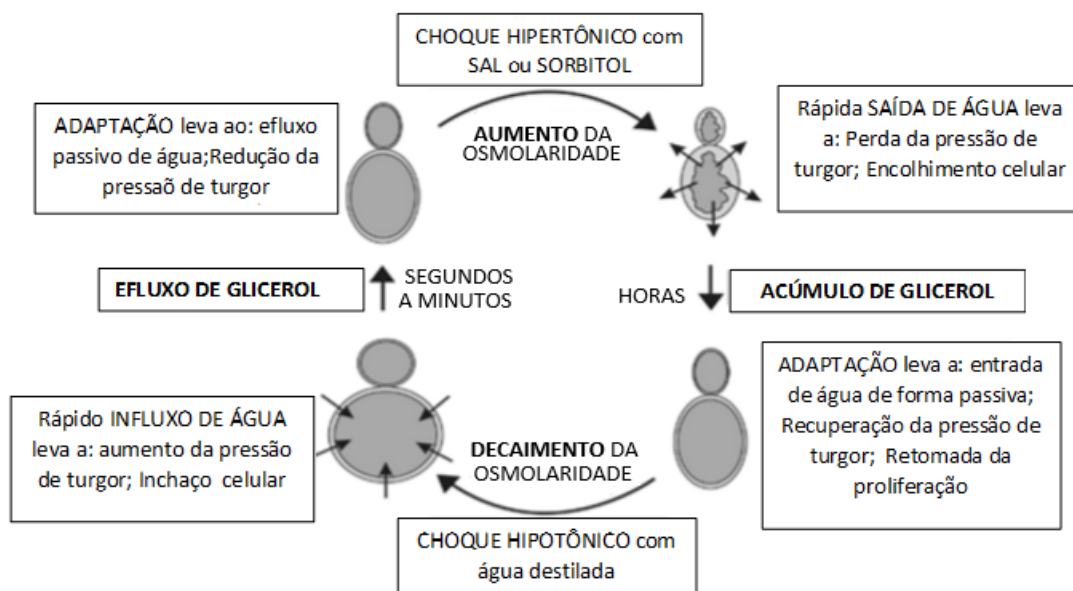


Figura 4 - Características básicas da resposta a estresse osmótico em *S. cerevisiae*. Fonte: Modificado de HOHMANN; MAGER, 2003.

Múltiplas vias metabólicas permitem à *S. cerevisiae* perceber e rapidamente responder às alterações osmóticas. A via mais proeminente é a Via HOG (*high osmolarity glycerol*), que são Proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) desencadeada por altas concentrações de solutos no meio, mas outras vias podem intermediar a sinalização ao estresse osmótico como a Proteína Quinase A. A ativação da Via HOG assegura o acúmulo de glicerol, reduzindo a diferença de pressão osmótica transmembrana e previne a perda de água. Os fatores de transcrição envolvidos na via HOG incluem Sko1, Hot1, Msn2, Msn4 assim como Smp1p (HOHMANN; MAGER, 2003; REP et al., 2000).

1.3.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é a resposta celular aos danos produzidos pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), como - ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) - ou por alterações do estado redox celular (SMART, 2008).

Durante a respiração mitocondrial, devido à alta concentração de oxigênio dissolvida no meio de cultura, proteínas, lipídios e DNA de diferentes componentes celulares podem sofrer danos oxidativos. A peroxidação lipídica pode levar à diminuição da fluidez da membrana e inativação enzimática, bem como diminuição da permeabilidade iônica. O dano oxidativo das proteínas pode levar à formação de peróxido hidrogênio, mudanças no peso molecular através da agregação proteica ou fragmentação da proteína através da ruptura da ligação peptídica. ROS também pode danificar estruturas de DNA através de determinadas reações que ocorrem com carboidratos e bases nitrogenadas. O DNA mitocondrial é mais propenso ao dano oxidativo do que o DNA nuclear devido ao fato do primeiro não ser protegido e estar localizado perto de um dos locais de produção da ROS (a cadeia transportadora de elétrons) (TOLEDANO et al., 2003).

Os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* são regulados principalmente pelos fatores de transcrição Yap1, Skn7, Msn2 e Msn4 (GASH et al., 2000; LEE et al., 1999; MORGAN et al., 1997; TAKEUCHI et al., 1997). Esses fatores de transcrição coordenam coletivamente respostas apropriadas a diferentes estresses oxidativos, reprimindo ou regulando a transcrição de genes específicos, muitos dos quais estão associados a defesas antioxidantes (TEMPLE; PERRONE; DAWES, 2005).

1.3.3 Estresse Alcoólico

O etanol é um inibidor do crescimento em leveduras em concentrações relativamente baixas, inibindo a divisão celular, diminuindo o volume celular e a taxa de crescimento, enquanto que em concentrações elevadas reduz a vitalidade e aumenta a morte celular (BIRCH; WALKER, 2000).

Esse produto da fermentação alcoólica também influencia no metabolismo celular e na biossíntese de macromoléculas. O etanol aumenta a frequência de mutações na célula, desnatura proteínas intracelulares e enzimas glicolíticas, e para reverter os danos, uma das soluções encontradas pela célula é a indução de proteínas de choque térmico (HU et al., 2007).

Os principais locais de efeito do etanol na levedura são as membranas celulares, as proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas e o retículo endoplasmático (WALKER, 1998). A estrutura e função da membrana parecem ser o alvo predominante do etanol, isso porque a exposição dessa estrutura ao álcool resulta num aumento da fluidez da membrana (MISHRA; PRASAD, 1989).

Os genes regulados na resposta ao estresse alcoólico estão envolvidos principalmente no metabolismo energético, endereçamento de proteínas, homeostase iônica e resposta ao estresse. Gash et al. (2000), retrata que os genes da família de resposta ao estresse ambiental (ESR) são superexpressos durante o estresse por etanol, sendo que de um total de 300 genes, 73 tiveram sua expressão aumentada. Entre eles foram encontrados um grupo em destaque, as HSPs. *HSP12*, *HSP26*, *HSP78*, *HSP104* foram reguladas positivamente durante o estresse do etanol (PIPER, 1995).

1.4 HSPS

Um exemplo já bem estabelecido de proteínas de estresses que cumprem funções homeostáticas são as proteínas de choque térmico (HSPs- *Heat Shock Proteins*)

que controlam o dobramento de proteína (possuindo papel de chaperonas) e são induzidas por uma variedade de fatores estressantes (KURTZ et al., 1986).

Em *S. cerevisiae*, as HSPs incluem Hsp104p (família Hsp100), membros do tipo Hsp82 (família Hsp90), membros da família Hsp70, a família Hsp60, a família Hsp40, e as pequenas HSPs, que inclui as proteínas Hsp30, Hsp26, Hsp12, e Hsp10 (LINDQUIST; CRAIG, 1988). As proteínas dessas famílias podem ser distinguidas entre elas com relação a sua estrutura e função, mas a maior parte dessas moléculas forma uma rede proteica necessária para estabilização de peptídeos além de suprimir a agregação de proteínas e facilitar seus dobramentos (FELDMANN, 2012).

1.5 A IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA HSP12

A proteína Hsp12 faz parte da família das HSPs, incluída no grupo das pequenas HSPs; possuindo 109 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 11688.8 Da. Essa pequena proteína hidrofílica é produzida em resposta a várias condições estressantes e não somente em situações de variação de temperatura. Nas leveduras, é possível observar uma grande produção de Hsp12 desencadeada por estresse osmótico, estresse alcoólico, oxidativo, diminuição de glicose, dentre outros. Esta também é produzida no início da fase estacionária. A mobilização da célula para o aumento de Hsp12 é devido à sua função de promover a manutenção da organização da membrana e da parede celular durante condições de estresse (REP, 1999; SALES et al., 2000; WELKER et al., 2010).

A Hsp12 pode ser encontrada na forma desdobrada no citoplasma e na forma de estruturas helicoidais na membrana plasmática. Esse dobramento é desencadeado por interações lipídicas (com lipídios negativamente carregados) e essa inserção na membrana a estabiliza, protegendo-a contra estresses. A presença dessa proteína não altera a composição lipídica geral da membrana, mas aumenta sua estabilidade. Estudos prévios de imunohistoquímica já evidenciaram a presença da Hsp12 na parede celular, indicando que esse polipeptídeo está nas imediações da

membrana/parede celular (WELKER et al., 2010). Sales (2000) demonstrou através de um sistema modelo de membrana que a Hsp12 age de maneira homóloga à trealose, proporcionando proteção à integridade da membrana contra dissecação e estresse induzido por etanol.

Cepas de leveduras nocauteadas no gene *HSP12* também foram incapazes de crescer em meio líquido na presença tanto de 12 mM de Cafeína ou 0,43 mM de Congo Red, que são moléculas conhecidas por afetar a integridade da parede celular. O volume dessas células mutantes foi menos afetado por rápidas mudanças na osmolaridade do meio de cultura do que as cepas selvagens, sugerindo o papel de Hsp12 na flexibilidade da parede celular (MOTSHWENE et al., 2004).

A proteína Hsp12 é superexpressa até 100 vezes mais em resposta a estresses e sua regulação é feita através das vias HOG e Ras-Pka (SIDERIUS; ROTS; MAGER, 1997; WELKER et al., 2010).

O gene *HSP12*, que possui nome sistemático YFLO14W, está localizado no cromossomo 7 (*Saccharomyces genome Database*, 2017). Na sua região promotora, já foram mapeados 11 elementos responsivos a estresses já conhecidos, que estão localizados dentro de 700 pb antes do códon de iniciação do gene (Figura 5). Dentre esses elementos, vários destes são sequencias consenso de STRE. A presença desses elementos responsivos indica que *HSP12* é ativado na resposta geral a estresse em leveduras (KARREMAN; LINDSEY, 2005).

Segundo Carrasco (2001), esse gene pode ser utilizado como marcador de análise de resistência em cepas comerciais de vinho, e Karreman (2005) utiliza esse mesmo gene para uma rápida avaliação para determinar o status do estresse em *S. cerevisiae* através do monitoramento da expressão de Hsp12 fusionada com GFP.

A expressão de Hsp12 é um sensor robusto e sensível a muitos estresses e parte integrante da iESR. Em experimentos anteriores, utilizando mRNA e proteína, verificou-se que Hsp12 pode ser um gene repórter de estresse altamente sensível, principalmente devido ao fato de sua indução ser em grande parte dependente de Msn2/4 (BERRY et al., 2008; CAUSTON et al., 2001; GASH et al., 2000; SADEH et al., 2011).

-700	CACAGAAAAGTGGGAGAAAGGTAGGGGGAGTCAGAGAATGAAGAAAAAAGGGGACGCGCA
-641	AATCCAAGTGAAAATCTCCGGGAGCGGGCGGATCCCCTAACGGCCCAGCCGAAAATGGA
-581	AAAAAAGGGTCGGTGATGTGTGGGTGCCAGCTGGCGGTAGCAATGACGACGTGTTGACGG
-521	GCCCTTGGCTCTTGGGACAAGGACTAGAAGCCAAAAGCCAGAGGCGGTAAAAATAGCAAG
-461	ACTAGAATATTGCTGGCATCTGTTAAGGGGATATGTTGCAACTTGCAGGGGGCGGCACAA
-401	AATAACATAGAAACGTAGTAAAGAGGGGAAAAAGGAAAAAGGAAAAAGGAAGGAAAA
-341	AAACCCATTGACGTAGAAATTGAAAAGAAAGGAAAGGTATACGCAAGCATTAAATACAACCCA
-281	CAAAACACAGACCAGAAAGCACTCTAGACGGAGAGTAAGTATAGATCTACAGCCCCCTGGAAAAAT
-221	CGTTTGCTCAACTTTGAGGTTCCGGTCTGTCCTCCCTCTTGATCTGAAAGGTCCTTCTCTAA
-161	ATCTATATTAAAAACGTATAAATAGGACGGTGAATTGCGTTCTACTTCTCAATTGCGTTT
-100	GATCTTATTTAATCTCTCTCTAATATATAGAAAAAAAACCATCTGATTATTTCGATAATC
-40	TCAAACAAACAACTCAAAACAAAAAACTAAATACAACAATGTCTGACGCAGGTAGAAA
21	AGGATTCTGGTGAAAAAGCTTCTGAAGCTTTGAAGCCAGACTCTCAAAAGTCATACGCTGA
81	ACAAGGTAAGGAATACATCACTGACAAGGCCGACAAGGTCGCTGGTAAGGTTCAACCAGA
141	AGACAACAAGGGTGTCTTCCAAGGTGTCCACGACTCTGCCGAAAAAGGCAAGGATAACGC
201	TGAAGGTCAAGGTGAATCTTTGGCAGACCAAGCTAGAGATTACATGGGAGCCGCCAAGTC
261	CAAGTTGAACGATGCCGTGGAATATGTTTCCGGTCTGTCTCACGGTGAAGAAGACCCAAC
321	CAAGAAAGTAA

Figura 5 - A região promotora de *HSP12* contém 11 elementos responsivos a estresse já conhecidos entre a posição -700 e +1pb. Fonte: KARREMAN, 2005.

Cepas de levedura $\Delta msn2\Delta msn4$ possuem pouca resposta de Hsp12 sob uma variedade de condições. Essa indução residual de Hsp12 sugere que fatores adicionais podem ativar a produção da proteína, embora essa contribuição seja inferior a 20% da resposta de indução nas cepas selvagens (GUTIN et al., 2015).

A membrana é uma das organelas mais afetadas por estresses fermentativos e a Hsp12 é fundamental para uma estabilização da membrana e aumento da sua sobrevivência frente a condições tão diversas. Pouco se sabe sobre a produção continuada dessa proteína frente a estresses consecutivos. Sabe-se que a adaptação das leveduras a estresses é fundamental para a eficiência do processo fermentativo, justamente porque esses estresses estão presentes durante todo processo e o surgimento dessas variações pode ser em conjunto. Faz se necessário o desenvolvimento de estudos e protocolos que visam a exposição das leveduras a estresses consecutivos pois essa natureza mais se assemelha àquela exposta à célula no ambiente industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações morfológicas e produção da proteína Hsp12 em células de *S.cerevisiae* submetidas a estresses consecutivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Mensurar a variação de tamanho das células em meio de cultura rico e em estresses sequenciais;

Quantificar os níveis da proteína Hsp12 em leveduras submetidas a estresses isolados e sucessivos;

Acompanhar, através de fluorescência, a produção da proteína Hsp12 numa mesma célula durante os estresses;

Buscar a localização subcelular da proteína durante os estresses sucessivos.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CEPA DE LEVEDURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A cepa de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a HSP12-GFP (YMS140α *HSP12::HSP12-GFP-HIS3MX6*) cedida pelo Dr. Jenia Gutin, The Hebrew University of Jerusalém, Israel. As células estão estocadas a -80°C em 15% de glicerol na biblioteca do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Núcleo de Biotecnologia - UFES). Uma alíquota foi retirada da biblioteca, plaqueada em meio YEPD sólido (Glicose 2%[w/v], Extrato de levedura 1%[w/v], Peptona 2%[w/v], Ágar 2%[w/v]) e incubada por 48 horas a 28°C.

A cada novo experimento uma colônia da placa foi retirada e crescida em meio YEPD líquido (Glicose 2%[w/v], Extrato de levedura 1%[w/v], Peptona 2%[w/v]) a 28°C sob agitação orbital (160 rpm), por 16 horas. Uma nova alíquota foi feita a partir do pré-inóculo, retirando 500μL deste e incubando-o em 50 mL de YEPD líquido a 28° C com agitação por 2 a 4 h até chegar a fase exponencial de crescimento (aproximadamente 1×10^7 células/mL).

3.2 TRATAMENTOS

3.2.1 Estresses isolados

As células foram crescidas a 28 °C com agitação em meio YEPD líquido até a fase logarítmica de crescimento, como descrita no item 3.1, antes de serem submetidas aos tratamentos subletais de etanol, peróxido de hidrogênio e osmolaridade. Para o tratamento com Etanol, as células foram incubadas em YEPD líquido suplementado com 8% (v/v) de etanol por 30 min a 28 °C a 160 rpm. O tratamento com peróxido de

hidrogênio foi feito com a incubação das células em YEPD suplementado com 0.6mM de H_2O_2 por 30 min sob agitação. Para o estresse osmótico, as células foram incubadas em YEPD líquido contendo 1 molar (M) de sorbitol (Figura 6). A cada 15 min alíquotas de 100 μL foram retiradas para análise da proteína *HSP12-GFP* e ao final dos 90 min de estresse foi avaliada a viabilidade da população, ambos por citometria de fluxo.

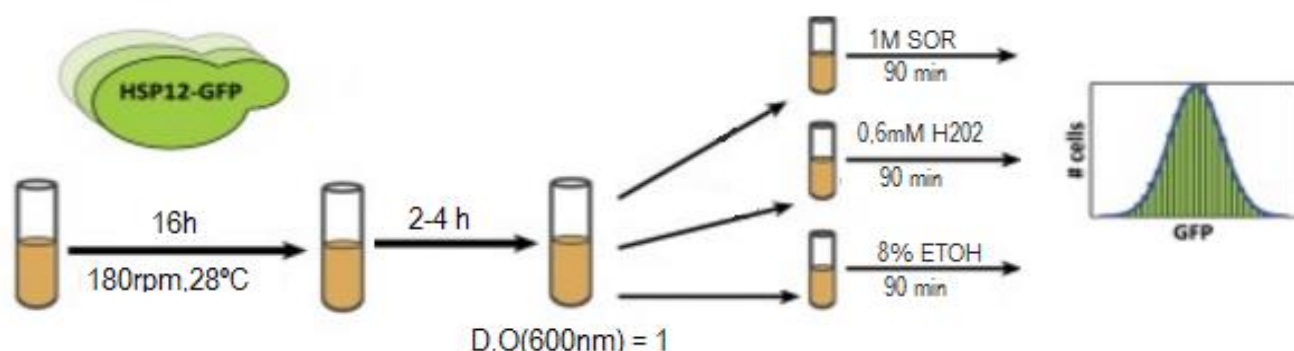


Figura 6 - Método para aplicação dos estresses isolados em leveduras na fase exponencial de crescimento.

3.2.2 Estresse Consecutivos

Nos estudos de resposta a estresses consecutivos, as células foram crescidas em meio YEPD líquido até a fase logarítmica e, em seguida, foram submetidas aos tratamentos obedecendo a seguinte ordem: Inicialmente o inóculo foi centrifugado e ressuspensionado no YEPD líquido contendo 1M de Sorbitol. Após 90 minutos a 28°C em agitação, a suspensão contendo as leveduras foi centrifugada e ressuspensionada em YEPD acrescido de 0,6mM de H_2O_2 e, após 90 minutos, as células foram incubadas em YEPD líquido suplementado com 8% (v/v) de etanol (Figura 7). O tempo total de experimento foi de 4h e 30 min, sendo que a cada 15 minutos foi retirada uma alíquota para análise da fluorescência da proteína no citômetro de fluxo. A cada 90 minutos foi retirado uma segunda alíquota para análise de viabilidade celular.

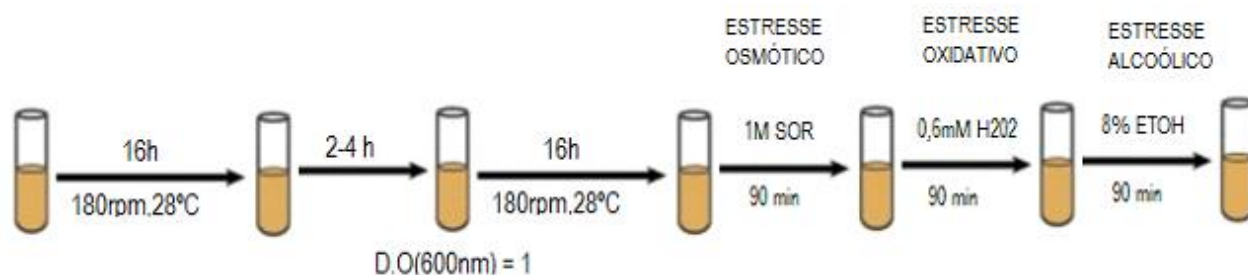


Figura 7 - Método para aplicação dos estresses consecutivos em leveduras na fase exponencial de crescimento.

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO

As análises de citometria de fluxo foram realizadas em um equipamento Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) equipado com dois lasers de excitação, um na faixa do azul de 20 mW (488 nm) e um na faixa do violeta de 50 mW (405 nm), ambos com três canais de detecção.

No citômetro de fluxo, a amostra contendo a suspensão de células é aspirada pelo equipamento e conduzida por um fluxo contínuo até a interceptação do feixe luminoso do laser. A população de interesse é selecionada dentre todos os eventos detectados pelo aparelho por uma série de parâmetros de *threshold* e voltagens que deverão ser estabelecidas pelo usuário. No trabalho a cada leitura um total de 20.000 células foram selecionadas para a elaboração dos gráficos do tipo “dot plot” e “density plot”. Após realizar as leituras, selecionou-se manualmente a população formada através da ferramenta “gate” do *software* gerando histogramas de intensidade de fluorescência.

As intensidades de fluorescência de 20.000 eventos por amostra foram compiladas em histogramas, as medianas foram calculadas e os dados foram reunidos em gráficos de barras para melhor visualização dos resultados. O processo pode ser observado na Figura 8.

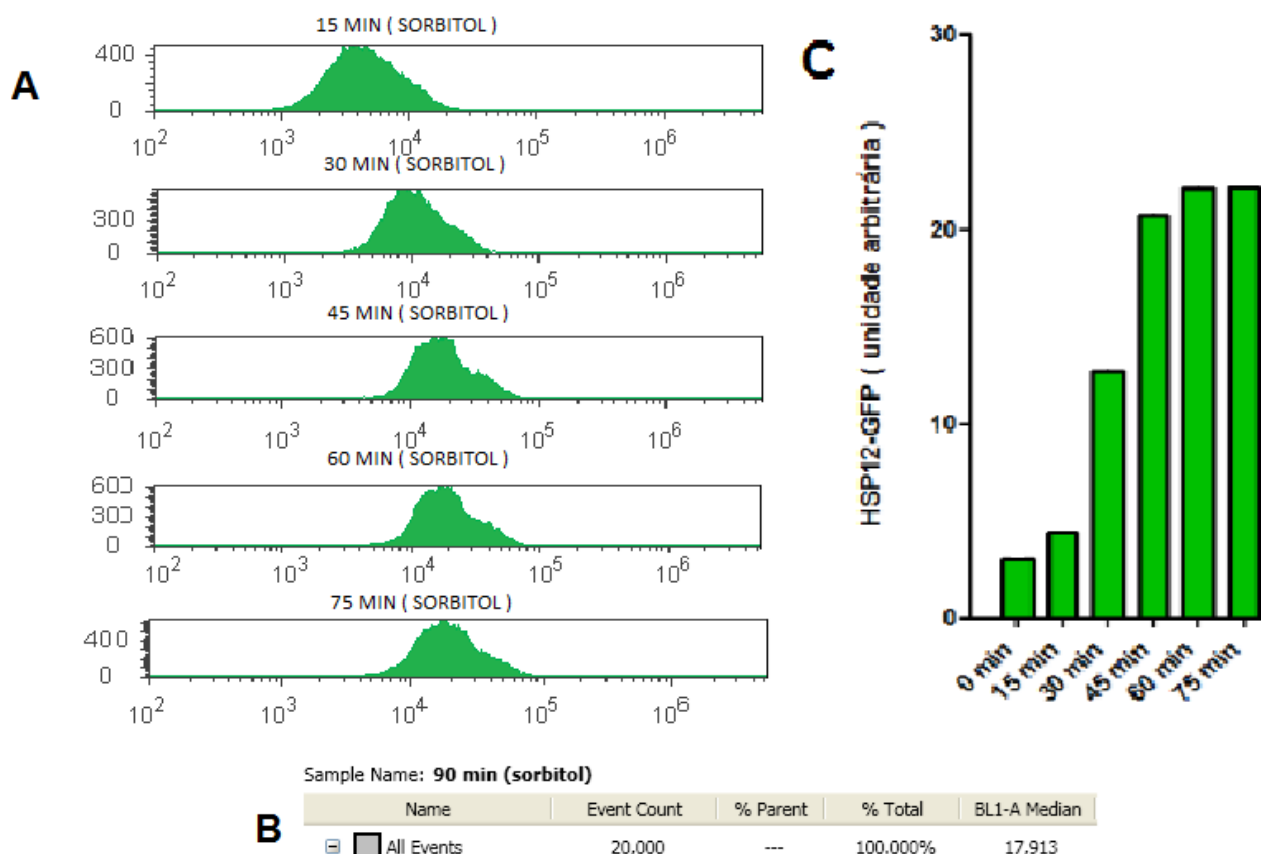


Figura 8 - Método para construção de gráficos de barras a partir dos histogramas do citômetro de fluxo. Os histogramas são feitos a partir da obtenção da fluorescência de 20.000 células e os gráficos de barras foram construídos a partir da mediana dos histogramas. A) Histogramas de fluorescência em diferentes tempos, B) Dados estatísticos de 20.000 eventos, C) Gráficos de barras confeccionadas com as medianas dos histogramas.

3.3.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular analisada por citometria de fluxo foi realizada através do uso do kit LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O kit é composto por dois fluoróforos: SYTO 9 - corante fluorescente de ácido nucleico que cora tanto células vivas quanto células mortas e Iodeto de Propídio (PI) - corante fluorescente que também cora ácidos nucleicos penetrando apenas em células com a membrana danificada.

Para a análise, coletou-se uma alíquota de 100 μL do inóculo em um microtubo que já continha 900 μL de tampão fosfato-salino (PBS), diluindo a amostra a 1×10^6

células/mL. O microtubo foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos, descartando o sobrenadante logo em seguida e ressuspensando o pellet novamente em tampão (x 2). O processo de coloração foi realizado adicionando 1 µL de SYTO 9 e 1 µL de PI ao microtubo com a amostra previamente lavada. Após a adição dos corantes, o microtubo foi gentilmente vortexado, envolvido em papel alumínio e incubado a 37 °C por 15 minutos. Para a leitura, o equipamento foi configurado para emitir o laser azul (488 nm) e coletar a fluorescência através dos detectores BL1 (530/30 nm) e BL3 (640 nm).

3.3.2 Análise da expressão de *HSP12-GFP*

A avaliação da proteína *HSP12-GFP* foi feita através da quantificação da fluorescência de GFP (Green fluorescent protein) por citometria de fluxo. Dos inóculos contendo os estresses foram retiradas alíquotas de 100µL que foram suspendidas em solução de PBS. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e estas foram ressuspendidas novamente em tampão. A análise de proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência foram obtidas através de histogramas e estatísticas do próprio Attune®, a partir da contagem de 20.000 eventos para cada amostra. A proteína GFP quando excitada pelo raio laser do citômetro emite luz que é detectada pelo filtro de 530 nm (BL1), capaz de detectar, portanto, a fluorescência verde da proteína.

3.4 CELLASIC

O CellAsic é um sistema de cultura de células que permite análise de células vivas a longo prazo com troca de soluções, podendo analisar uma mesma célula ao longo de todo o experimento. O design das placas permite que a célula seja exposta a diferentes soluções e condições através de canais de fluxo pressurizados, e os

intervalos de tempo e as taxas de fluxo podem ser especificadas pelo usuário. A placa de microfluidos utilizada foi a Y04C específica para cepas haploides (Figura 9). Três dos seis poços de entradas foram preenchidos com 200µL de YEPD contendo os estresses fermentativos utilizados neste trabalho e o poço destinado às células foi preenchido com 100µL do inóculo.

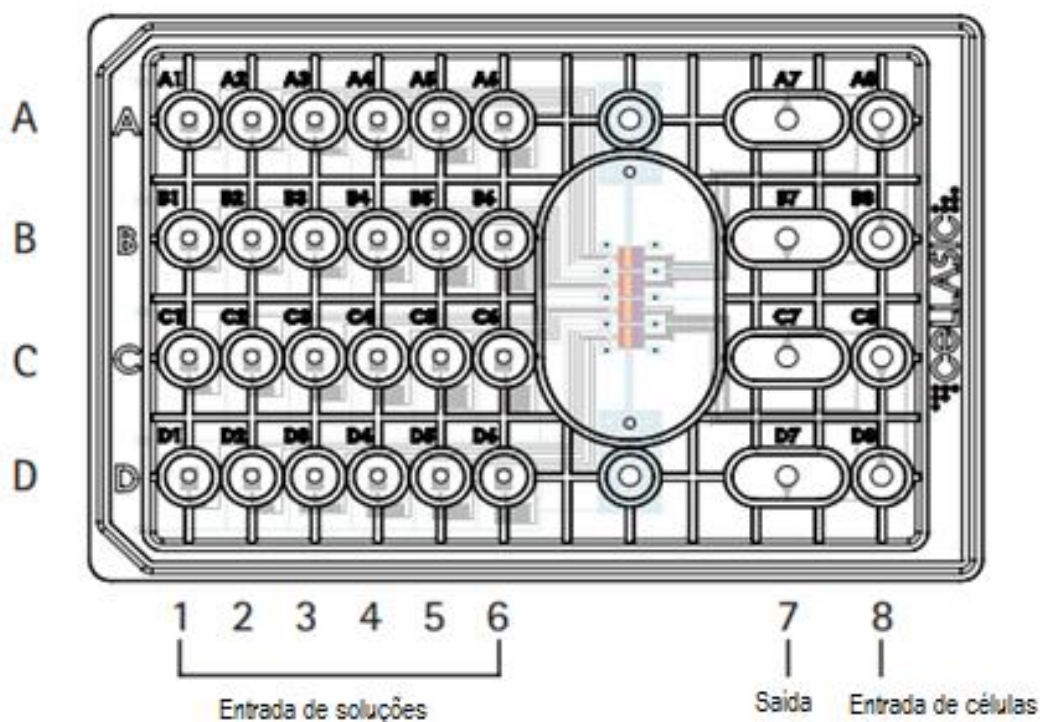


Figura 9 - Configuração da placa Y04C do CellASIC. A placa possui 4 unidades independentes (A-D), cada uma possui 6 poços de entrada (1-6), um poço para as células (8) e um grande poço de descarte (7). Fonte: Manual CellASIC ONIX.

As taxas de fluxo utilizadas durante o experimento foram de 2 psi. O CellASIC ONIX FG- Y04C foi o software utilizado para a criação do protocolo que consiste na submissão de estresses consecutivos nas células com troca de soluções a cada 90 minutos. O coletor utilizado foi o CellASIC™ ONIX Microincubator Controller e estabeleceu-se a temperatura de 28°C para todo o tempo de experimento.

Dessa maneira, no início do procedimento a válvula 1 liberava o poço A1 contendo a solução de YEPD acrescido de Sorbitol 1M, numa pressão de 2 psi, por 90 minutos. Ao final desse tempo, a válvula 1 foi fechada e o sistema acionada a válvula 2. Essa válvula liberava o conteúdo do poço A2 que possuía a solução de YEPD que continha 0,6 mM de H_2O_2 . Novamente, após 90 minutos, a válvula V2 foi bloqueada, e o sistema liberava por fim o funcionamento da válvula 3 (V3). A V3 estava ligada ao poço A3 em que YEPD + 8% de etanol foram adicionados, deste modo a célula foi banhada por mais 90 minutos com essa solução. Após um total de 270 minutos (4h e 30 min), o *software* indicava o fechamento de todas as válvulas e o fim do experimento.

3.5 MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA E NIS ELEMENTS

As imagens digitais foram adquiridas com o microscópio invertido Eclipse Ti (Nikon, Japão) acoplado à câmera digital DS-Qi1MC (Nikon, Japão). Para a identificação e localização da *HSP12-GFP* nas células foi utilizado o filtro At-GFP/F LP (Nikon, Japão). As imagens foram feitas a cada 30 minutos de experimento com objetiva de 100x. A partir das imagens foi possível a visualização da proteína e medição da variação do tamanho ao longo de experimento. O programa utilizado para aferição das medidas foi o NIS ELEMENTS. O diâmetro maior foi selecionado para o acompanhamento das variações de tamanho nas células.

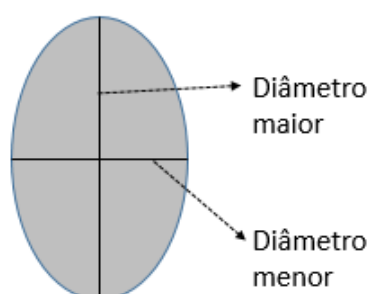


Figura 10 - Representação do diâmetro maior e menor em leveduras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SOBREVIVÊNCIA AOS ESTRESSES FERMENTATIVOS

A cepa utilizada no trabalho foi submetida a três tipos de estresses: osmótico, oxidativo e alcoólico por períodos de 90 minutos com intuito de verificar a resistência da levedura a estresses fermentativos. Os estresses foram escolhidos por serem estresses comuns a processos industriais de fermentação.

As porcentagens de sobrevivências das populações após 90 minutos de estresse podem ser observadas na Figura 11. Esses resultados revelam que os valores de estresse escolhidos são considerados não letais para a cepa estudada.

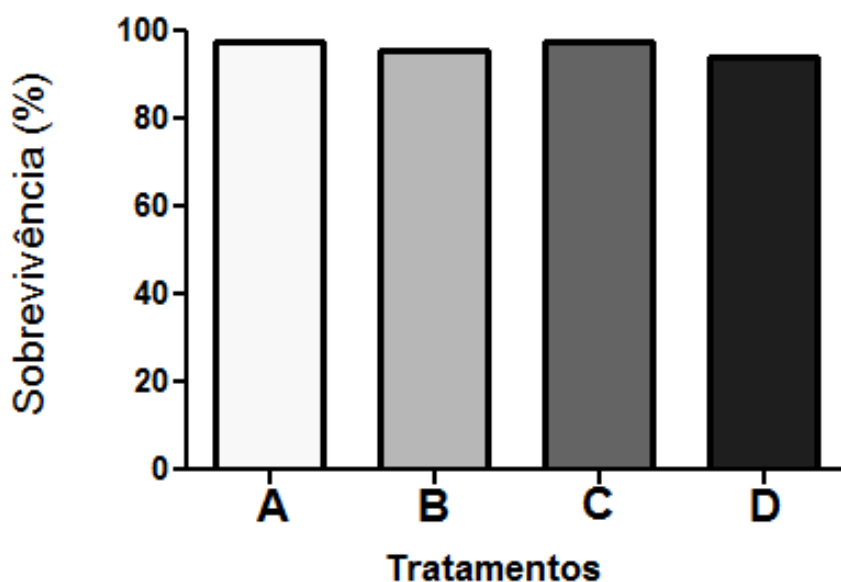


Figura 11 - Sobrevivência das leveduras *S.cerevisiae* após 90 minutos submetidas à estresses fermentativos. A) Controle-YEPD, B) Estresse Osmótico - 1M de Sorbitol, C) Estresse Oxidativo – 0,6mM de H_2O_2 , D) Estresse Alcoólico - 8% Etanol (v/v).

A cepa utilizada apresenta sobrevivência maior do que 95% em todos os tratamentos escolhidos. A alta sobrevivência da cepa indica que a escolha dos estresses foi eficaz, pois o objetivo do trabalho foi observar como a célula se adapta à variação de agentes estressantes comumente encontrados em ambientes fermentativos. A intenção era estudar o comportamento e adaptação a estresses, juntamente com a expressão de proteínas, em situações que não fossem extremas, pois o objetivo não é avaliar a forma de morte celular e sim como essa cepa se adaptaria em ambiente semelhante aos encontrados em condições industriais.

4.2 VARIAÇÃO DO TAMANHO DAS CÉLULAS EM YEPD

O experimento a seguir foi realizado com intuito de observar a variação do volume celular de *S. cerevisiae* adultas e jovens em meio de cultivo sem adição de estresse. Através do CellAsic foi possível acompanhar a variação do tamanho de uma mesma célula ao longo de todo o experimento.

Numa população de leveduras que se apresentam na fase logarítmica de crescimento é possível a observação do crescimento de células adultas e da formação e crescimento de gêmulas. Por isso foi observado a variação de tamanho de células adultas (que apresentavam gêmulas) e de brotos. O tempo de experimento foi de 270 min (Figura 12).

As células adultas analisadas possuíam um tamanho entre 6-7 μm e, ao longo dos 270 min em que elas permaneceram em contato com YEPD, sem adição de agentes estressantes, não houve grande variação de tamanho. Com relação à reprodução assexuada foi contabilizada uma média de duas gemulações durante 270 min, tendo em vista que o tempo de duplicação médio de leveduras haploides é de 99 min em meio rico (TALIA et al., 2007).

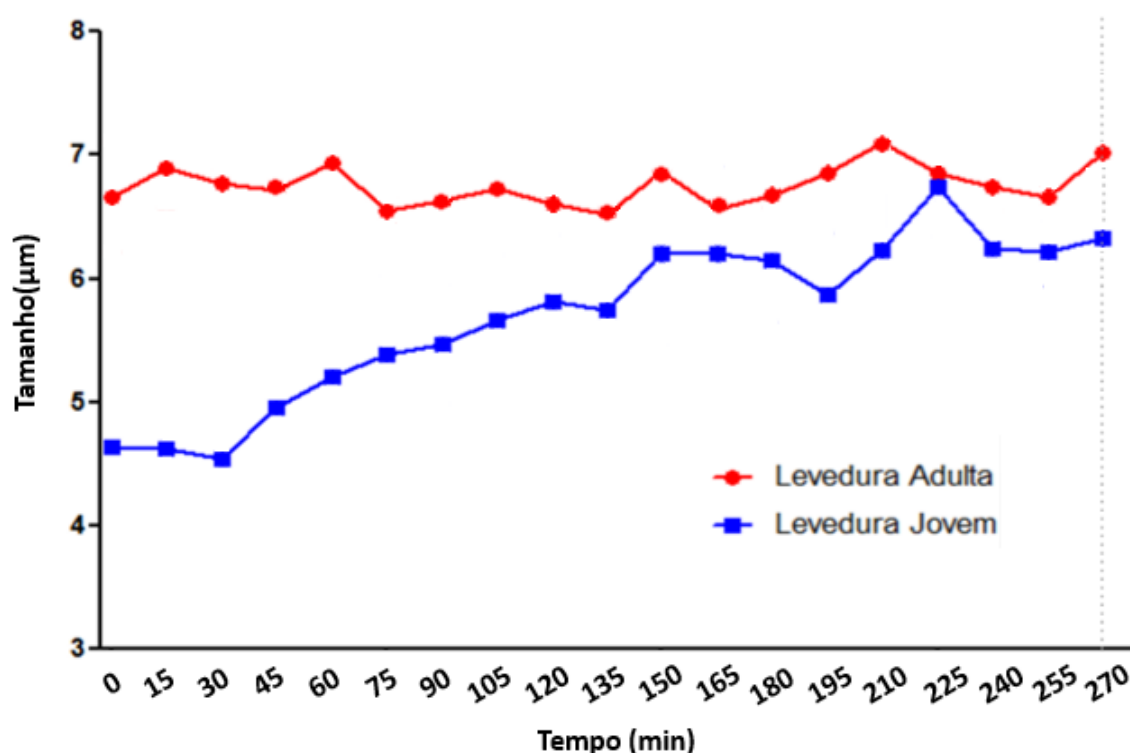


Figura 12 - Variação do tamanho de leveduras durante 270 minutos em meio rico (YEPD líquido) sem adição de estresses. A cada 15 minutos foi aferido o tamanho das células jovens e adultas. A linha de variação representa o padrão de uma mesma célula ao longo do tempo.

As células jovens (células-filhas) selecionadas possuíam tamanho entre 4-5 μm de tamanho. Observou-se uma maior porcentagem de crescimento dessas células, comparada às células adultas, chegando a um aumento de mais de 30% do tamanho durante os 270 minutos de experimento. A média de gemulações observada foi de um brotamento durante todo o experimento. Segundo Ferrezuelo et al (2012), células de levedura em crescimento precisam de um “gatilho” para entrarem no ciclo celular, e esse sinal só é liberado pela célula após esta atingir um tamanho crítico que é definido pelas condições externas a ela.

4.3- VARIAÇÃO DO TAMANHO DAS CÉLULAS DURANTE ESTRESSES CONSECUTIVOS.

Com o objetivo de observar o efeito de estresses sucessivos no tamanho das leveduras, foi analisado através do CellAsic, a variação do tamanho de células vivas ao longo de 270 minutos de experimento.

Como dito anteriormente, o CellAsic possui uma versatilidade que é a observação de uma mesma célula viva ao longo do tempo. Assim, as mesmas leveduras foram estressadas com três estresses consecutivos: estresse osmótico, oxidativo e alcoólico, respectivamente. A escolha da sequência dos estresses assemelha-se à forma como esses estresses são expostos às leveduras em dornas de fermentação. Os dados de variação de tamanho e brotamento foram obtidos através da análise de células adultas e células-filhas em fase logarítmica de crescimento.

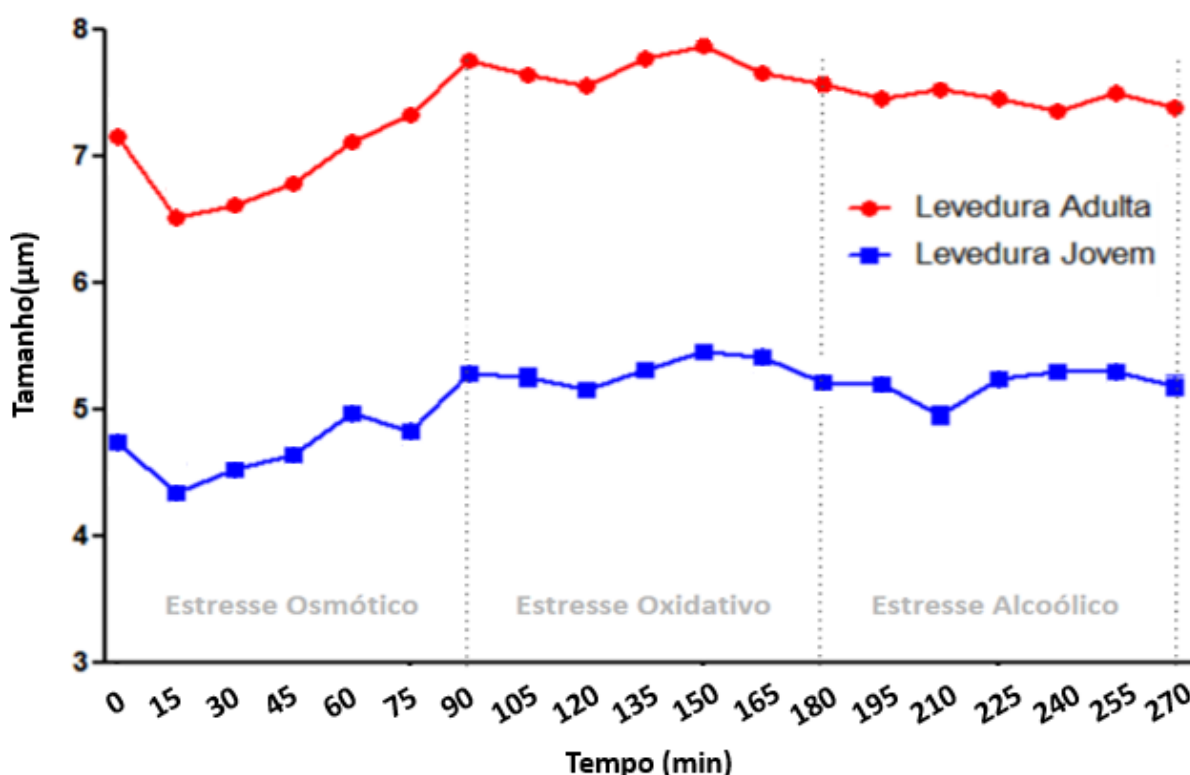


Figura 13 - Variação do tamanho da levedura *S. cerevisiae* durante 270 minutos submetida a estresses fermentativos. Inicialmente as células foram submetidas ao estresse osmótico (1M Sorbitol), em seguida ao estresse oxidativo (0,6mM de H_2O_2) e, por fim, ao estresse alcoólico (8% ETOH). A cada 15 minutos foi aferido o tamanho das células jovens e adultas. A linha de variação representa o padrão de uma mesma célula ao longo do tempo.

Os resultados mostraram que tanto as células adultas quanto as jovens apresentaram comportamento diferente do encontrado no experimento controle, onde as leveduras foram crescidas em meio YEPD.

Tanto as células adultas quanto as jovens apresentaram uma diminuição de tamanho no início do estresse osmótico, com decréscimo no tamanho nos primeiros 15 min de exposição ao estresse. Após essa diminuição inicial, notou-se um aumento progressivo da célula de 30 min até 90 min de experimento, e esse comportamento se encerra com a finalização do estresse osmótico (Figura 13). Durante todo o estresse oxidativo, as células apresentaram uma variação do tamanho de forma balanceada, sem muitas mudanças drásticas aparentes. O tamanho diminuiu novamente somente quando a célula foi exposta ao meio YEPD contendo 8% etanol (Figura 13).

Quando as células são expostas a um aumento na osmolaridade, inicialmente há uma perda de água intracelular, levando ao seu encolhimento. Essa redução da célula pode ser concluída dentro de dezenas de segundos (HERSEN et al., 2008; HOHMANN, 2002; PETELENZ-KURDZIEL et al., 2011). Esse comportamento pôde ser observado tanto nas células jovens quanto nas células adultas submetidas a tratamento com 1M de Sorbitol.

Estresse oxidativo também causa uma diminuição no volume médio da célula em *S.cerevisiae*, quando são expostos a concentrações crescentes de H_2O_2 por mais de uma hora (CANETTA; WALKER; ADYA, 2009). A manutenção do tamanho das células evidenciada neste trabalho implica na escolha de somente um estresse oxidativo brando e por isso não foi possível observar mudanças no tamanho das mesmas nos 90 minutos em que foram submetidas ao estresse.

Com relação às mudanças morfológicas da célula da levedura em resposta ao estresse alcoólico, já descritas na literatura, é possível observar o encolhimento e invaginações celulares em leveduras em solução de etanol a 10%(v/v) após 15 minutos. E esse efeito resultou em diminuições contínuas no volume celular médio ao longo de um período de incubação (BIRCH; WALKER, 2000; PRATT; BRYCE; STEWART, 2003). Esse dado, encontrado na literatura, corrobora com os resultados obtidos no CellAsic tanto das células adultas quanto dos brotos.

Outra observação evidenciada neste trabalho foi a não formação de novos brotos tanto nas células adultas quanto nas células jovens submetidas a estresses sucessivos. Sabe-se que tratamentos estressantes causam uma parada no ciclo celular em G1. Essa parada se faz necessária para prevenção de danos durante as fases do ciclo celular, quando as células estão mais vulneráveis (Fase S e M) e permite adaptação durante a permanência da célula em G1 (HOHMANN; MAGER, 2003). Assim, a falta de novos brotos indica que provavelmente as células estavam na fase G1 do ciclo celular durante todo o experimento.

4.4 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE *HSP12-GFP* DURANTE ESTRESSES CONSECUTIVOS

Para a quantificação de Hsp12 e na busca por sua localização durante os estresses, foi utilizada a plataforma CellAsic. A célula foi submetida aos estresses consecutivos por 270 minutos e imagens foram capturadas a cada 15 minutos. Os resultados foram compilados na Figura 14.

Antes dos 30 minutos iniciais do estresse osmótico, a fluorescência da proteína foi muito baixa, sendo esta aumentada a partir dos 45 minutos de experimento, com um aumento progressivo até os 90 minutos. Após esse período há diminuição da emissão.

A fluorescência observada nas células é difusa e compreende todo o seu citoplasma. Esse dado corrobora com dados de literatura que definem que a proteína Hsp12 existe como uma proteína citossólica solúvel como também pode estar associada à membrana plasmática e à parede celular (MOTSHWENE et al., 2004; WELKER et al., 2010).

O experimento teve fim após os primeiros 30 minutos do estresse oxidativo porque a célula teve sua viabilidade afetada provavelmente pela potência do laser utilizado para observação da fluorescência.

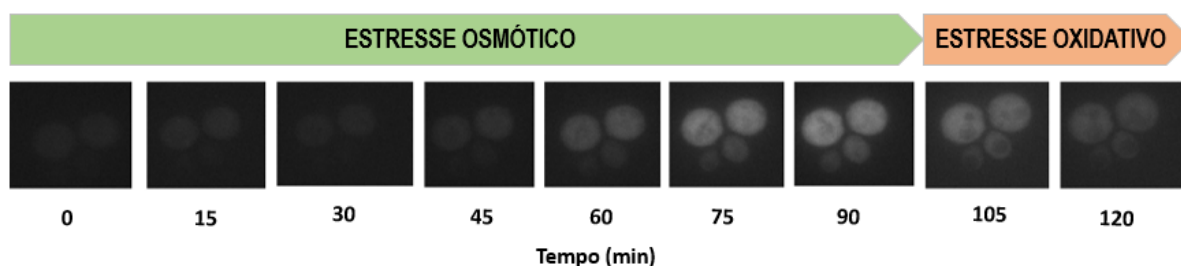


Figura 14 - Produção de Hsp12 em uma mesma célula durante estresses consecutivos. A célula foi submetida a 90 minutos de estresse osmótico e a 30 minutos de estresse oxidativo de forma consecutiva. A objetiva utilizada para visualização das células foi de 100x.

4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA HSP12

A quantificação de Hsp12 foi feita através da técnica de citometria de fluxo. A cepa utilizada possui fusão de GFP no gene *HSP12*, logo a fluorescência detectada corresponde à presença da proteína na célula.

4.5.1 Produção de *HSP12-GFP* durante estresses isolados.

Visando acompanhar a produção da proteína em estresses diferentes, inóculos contendo células na fase logarítmica de crescimento foram expostos separadamente a estresses osmótico, oxidativo e alcoólico. O tempo total de experimento foi de 90 minutos e as alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos para avaliar a quantidade de proteína (Figura 15).

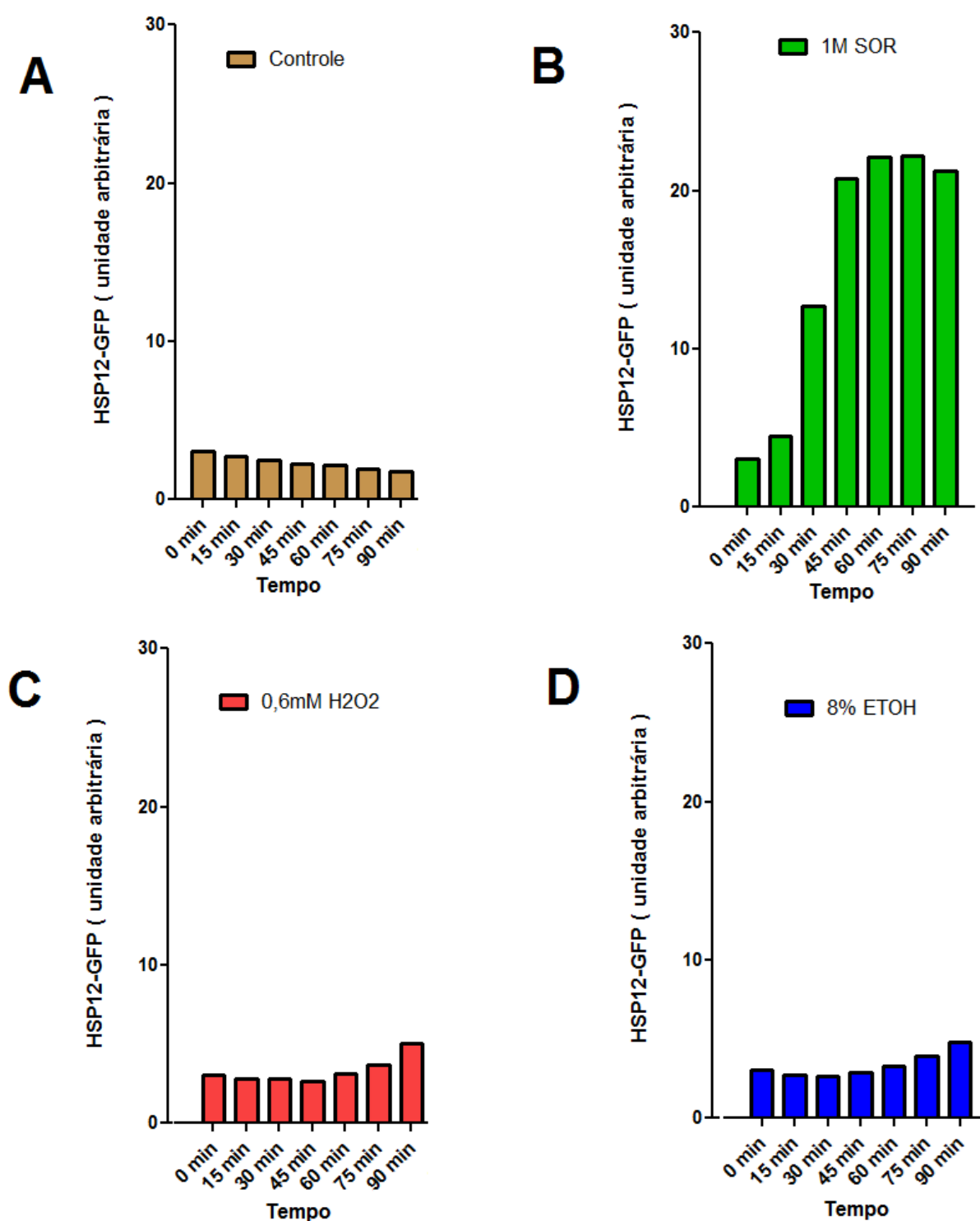


Figura 15 - Variação da proteína Hsp12 durante estresses isolados. Foi quantificado, por fluorescência, a proteína Hsp12 durante 90 min de experimento, através da citometria de fluxo. A cada 15 minutos era retirada uma alíquota, para análise da variação dos níveis da proteína. A) Experimento Controle (células crescidas em YEPD), B) Estresse Osmótico, C) Estresse Oxidativo, D) Estresse Alcoólico.

A presença de 1 M de Sorbitol no meio de cultura resultou numa produção notável de fluorescência a partir de 30 minutos, com o contínuo crescimento desta, chegando a máxima intensidade entre 60 e 75 minutos. Há uma diminuição da fluorescência nos 15 minutos finais do experimento.

A quantidade de Hsp12 na célula aumentou mais de 550% após 1 hora de estresse osmótico (Figura 15), tendo em vista que resultados anteriores indicaram que o estresse escolhido foi não-letal à levedura.

É possível encontrar uma resposta semelhante a esta em leveduras expostas a substâncias que também induzem estresse osmótico, como manitol e NaCl, com um pico máximo próximo aos 65 minutos e um ligeiro decaimento após esse momento. (KARREMAN; LINDSEY, 2005).

O gene *HSP12* é regulado de forma dependente de cAMP-PKA e o sorbitol desencadeia a via HOG (VARELA et al., 1995). Essa alta osmolaridade é detectada pelos sensores de membrana plasmática, Sho1p e Sln1p (MAEDA, 1995), que ativam Msn2/4. Portanto, a síntese de Hsp12 é desencadeada pela Hog1p (BREWSTER et al., 1993; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996).

A presença de detectores na membrana da célula pode justificar a rápida resposta a este estresse nas leveduras e essa alta produção de Hsp12 pode estar relacionada à sua função de manutenção da organização da membrana, claramente afetada pela variação de osmolaridade.

Neste trabalho, a produção de Hsp12 em resposta ao peróxido de hidrogênio e do álcool foi semelhante entre si e marcadamente diferente daquela observada no estresse osmótico. Observa-se um aumento da fluorescência a partir de 60 minutos de incubação (Figura 15), continuando até o final do experimento. Ambos os estresses possuíam níveis de *HSP12-GFP* muito menores comparados aos obtidos na população exposta ao sorbitol e isso pode indicar que o mecanismo de indução de Hsp12 por etanol e peróxido foi diferente daquele encontrado por hiperosmolaridade.

Há muita similaridade nos ativadores das vias de resposta (Fatores Transcricionais-TFs) a estresses, mas como foi possível observar nos resultados, a expressão

gênica não é equivalente nos diversos estresse. Assim como existe similaridade nesses fatores que iniciam o processo de adaptação, várias vias paralelas podem ser ativadas diferindo na resposta final, e consequentemente na produção de proteínas.

O resultado observado na Figura 15 destaca que a ativação de *HSP12* via Hog1p foi mais efetiva do que as vias ativadas por etanol e H_2O_2 .

4.5.2 Produção de *HSP12-GFP* durante estresses consecutivos.

A expressão de *HSP12-GFP* nas células que foram submetidas aos estresses consecutivos foi diferente daquele encontrado em decorrência a estresses isolados como mostra a Figura 16.

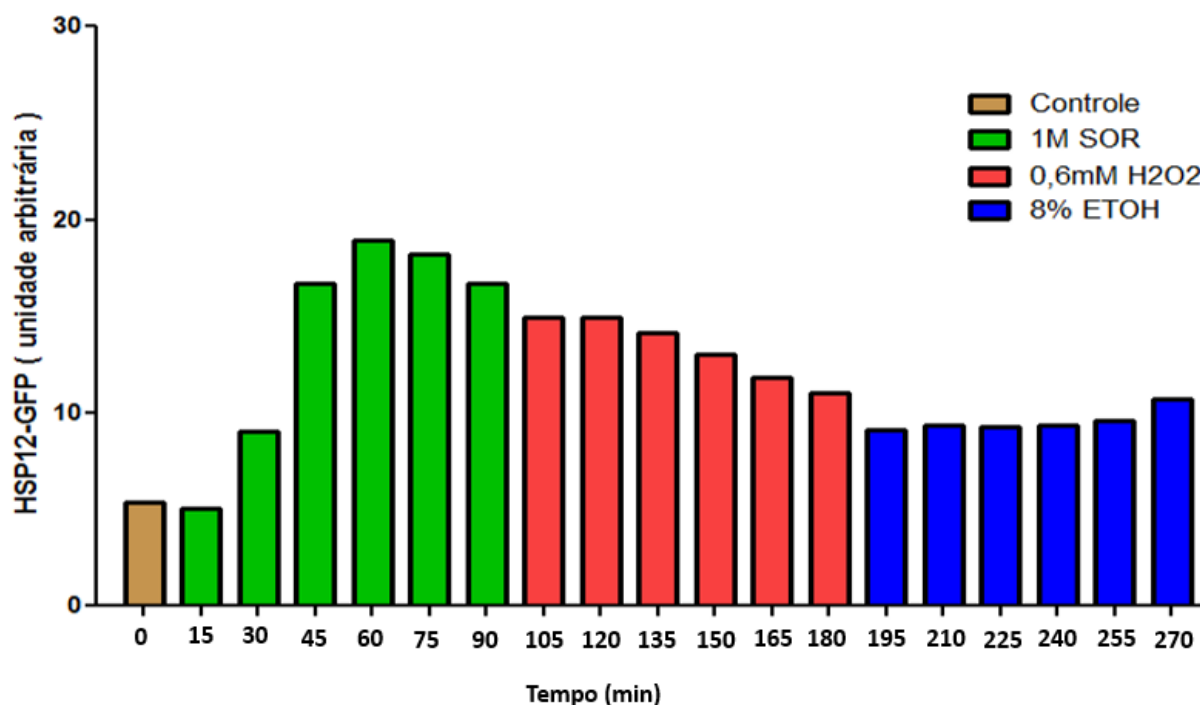


Figura 16 - Variação da proteína Hsp12 durante estresses consecutivos. Foi quantificado, por fluorescência, a proteína Hsp12 durante 270 min de experimento, através da citometria de fluxo. A cada 15 minutos era retirada uma alíquota, para análise da variação dos níveis da proteína. A sequência escolhida dos estresses foi: Estresse Osmótico, Estresse Oxidativo e Estresse Alcoólico.

Inicialmente, em função da presença de Sorbitol, a célula foi capaz de produzir uma quantidade considerável de Hsp12 num intervalo curto de tempo. Ao final do estresse osmótico, a mesma população de leveduras foi estressada com peróxido de hidrogênio e, como resultado disso, a produção da proteína se manteve num patamar elevado com um declínio constante até o fim desse estresse. O estresse seguinte foi o desencadeado pelo etanol e nesse momento a produção de Hsp12 foi estabilizada por quase 60 minutos com um ligeiro aumento da produção após esse horário (Figura 16).

A quantidade de Hsp12 observada tanto no estresse oxidativo quanto no estresse alcoólico nesse experimento foi distinta daquela encontrada no estudo de estresses isolados. Os valores observados nos estresses consecutivos foram muito maiores que aqueles observados no primeiro experimento.

As células de *S. cerevisiae* são expostas a muitos tipos de estresses diferentes durante bioprocessos industriais, tais como estresse oxidativo, congelamento/descongelamento, alta temperatura e etanol e é muito desejável a obtenção de cepas que são resistentes múltiplos estresses (ÇAKAR et al., 2005).

Uma das maneiras de aquisição de resistência é através da proteção cruzada. Nesse mecanismo, a resposta da célula a um estresse, induz a tolerância desta à estresses causados por outros agentes (BERRY et al., 2008; CULLUM; BENNETT; LENSKI, 2001; GREENACRE; BROCKLEHURST, 2006). Por exemplo, a exposição de células de levedura ao estresse salino pode melhorar sua adaptação ao estresse oxidativo (BERRY et al., 2008). A existência desses mecanismos sugere que exista um mecanismo interativo capaz de detectar e responder a diferentes formas de estresses, que envolve funções celulares tais como proteção celular, metabolismo energético e produção de proteínas protetoras (HSPs). Já se sabe que algumas das respostas mais notáveis associadas à proteção cruzada seja a produção de HSPs (LEE; LEE, 2005; SOTO et al., 1999; TROTT; MORANO, 2003). Essa forma de proteção é o efeito da ativação de um programa específico e geral de resposta ao estresse, que na levedura *S. cerevisiae* é conhecido como a resposta ao estresse ambiental (ESR).

Por ser uma proteína responsável por manutenção da organização da membrana e aumento da sua flexibilidade, Hsp12 é induzida em vários estresses fermentativos. E os resultados de citometria indicam que há aumento da produção de Hsp12 em estresses sucessivos, e ao que tudo indica essa indução foi decorrente da proteção cruzada provocada pelo choque osmótico causado pelo Sorbitol.

Outra explicação para o aumento de Hsp12 nos estresses consecutivos é um possível *crosstalk* entre vias de resposta a estresses. *Crosstalk* é definido como convergência de duas vias de sinalização de resposta a estresses diferentes, onde essas vias podem assumir caminhos diferentes e atingirem o mesmo fim ou estas podem ter caminhos interativos e afetar o resultado final. Diversas vias metabólicas são geralmente estudadas isoladamente em laboratório para simplificar a interpretação, mas na natureza, há uma combinação de estresses simultâneos e isolados temporalmente, e isso requer uma resposta integrada dessas vias (KNIGHT; KNIGHT, 2001).

O estresse hiperosmótico já demonstrou induzir a expressão de genes específicos ao estresse oxidativo, e isso indica que, provavelmente, relacionado com o fenômeno de proteção cruzada, diferentes estresses podem compartilhar peculiaridades (HOHMANN; MAGER, 2003). Zhao et al (2001) também comprovam que deficiências na via HOG, causam hipersensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Palhano et al, (2004) demonstraram aquisição de tolerância em *S. cerevisiae* quando submetida a alta pressão hidrostática (HHP) em resposta a um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio 0,4 mM, etanol a 6% e choque a frio (10°C), revelando que a resposta da célula a HHP compartilha características comuns com peróxido de hidrogênio e estresse por etanol mas diferem de alguma forma ao estresse por baixas temperaturas.

A pressão é um parâmetro físico que pode causar aos organismos efeitos relacionados a outros estresses, tais como a temperatura, o etanol e o estresse oxidativo (BRAVIM et al., 2010). Análises ao nível molecular mostram que a HHP ativa fatores transcricionais envolvidos com a expressão de genes de crescimento e adaptação ao estresse, ciclo celular e metabolismo energético e esses fatores pertencem a diversas vias de resposta a estresse (BRAVIM et al., 2012).

Assim a manutenção de altos níveis de Hsp12 estariam relacionados à ativação de vias não específicas para o estresse atual que levaria a uma resposta mais rápida quando a célula fosse submetida a um outro estresse consecutivo.

Outro resultado observado foi a diminuição da produção de Hsp12 durante a exposição das células ao H_2O_2 . Quando as células são colocadas em ambientes estressantes, elas respondem com uma parada no ciclo celular e uma massiva expressão gênica. No entanto, ao longo do tempo as células geralmente se adaptam a essas novas condições, e as alterações em nível de transcrição gênica diminuem, à medida que o crescimento e a tradução retomam suas atividades. Uma explicação para esse padrão de alterações na expressão gênica é que grandes alterações iniciais promovem um ajuste rápido na levedura, para que um estado homeostático seja atingido novamente (GASH, 2003).

Por isso uma alta produção de Hsp12 em resposta ao estresse osmótico pode ter promovido uma adaptação rápida às leveduras, e a ação da proteína tanto na membrana e na parede celular, foi suficiente para que a célula tolerasse o estresse oxidativo. A célula só passa a necessitar de um auxílio na manutenção da membrana quando as leveduras foram expostas ao estresse alcoólico, pois foi nessa fase do experimento que é notado uma estabilização da quantidade da proteína e uma tendência ao aumento ao final do experimento.

5 CONCLUSÃO

Após análise dos dados obtidos, pode-se inferir que a variação do tamanho de células-mães e filhas são diferentes durante seu crescimento em YEPD. As células adultas mantiveram seu tamanho e os brotos apresentaram um crescimento constante com o propósito de alcançar um tamanho crítico para dar início à gemulação. Já nos estresses sucessivos, tanto as células adultas quanto às jovens mantiveram um padrão de variação de tamanho igual entre si e diferentes dos resultados encontrados em YPED. A parada no ciclo celular, evidente nas células submetidas a estresses sucessivos, indica que mesmo em estresses onde a viabilidade da célula é alta, a parada no ciclo celular é uma estratégia para diminuição de danos à célula.

As análises de citometria demonstraram que *S.cerevisiae* possui uma produção diferenciada de Hsp12 nos estresses isolados comparada a estresses sucessivos. Essa diferença na quantificação da proteína indica que a maquinaria celular, manteve a produção de Hsp12 mais elevado nos estresses consecutivos, e esse efeito é desencadeado pelo mecanismo de proteção cruzada. O gene *HSP12* é considerado sensor da via de resposta ao estresse ambiental, e o resultado encontrado indica que ativação dessa via ocorre de forma singular em estresses consecutivos.

Estudos numa mesma célula viva também possibilitaram a observação mais minuciosa das mudanças morfológicas decorrentes da exposição de leveduras a condições estressantes. Foi possível observar a produção da proteína Hsp12 numa mesma célula durante os estresses, mas após 2 horas de experimento a célula diminuiu sua viabilidade provavelmente devido a potência do laser que indicia sob a célula. Isso indica que trabalho que visam observação de fluorescência em células vivas devem levar em consideração o tempo entre a obtenção das imagens, afim de preservar a integridade destas.

A partir da compilação e análises dos dados podemos compreender melhor a importância de Hsp12 na resposta celular a estresses fermentativos. Inúmeros estresses afetam a estabilidade da membrana e essa organela é essencial para a

adaptação e viabilidade celular. Estes resultados providenciam subsídio para um melhor entendimento da função de Hsp12 e esses resultados podem servir de parâmetro para a escolha de genes propensos a modificações genéticas em cepas industriais afim de melhorar a produtividade na indústria.

Em dornas de fermentação a levedura entra em contato com diversos estresse simultâneos e sequenciais, por isso o desenvolvimento de estudos com estresses consecutivos se mostrou eficiente visto que possibilita um melhor entendimento do real comportamento adaptativo das leveduras. O desenvolvimento de protocolos de estresses consecutivos tem um papel biotecnológico importante nas pesquisas voltadas para a indústria fermentativa, para identificação de outras vias metabólicas que possuem perfil diferenciado em resposta a estresses sequenciais.

REFERÊNCIAS

- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. **S AFR ENOL VITIC**, v. 21, n. Special, p. 27–51, 2000.
- BERRY, D. B. et al. Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.
- BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb Technol**, v. 26, p. 678–687, 2000.
- BLEONCA, I.; BAHRIM, G. Overview on Brewing Yeast Stress Factors. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 5, 2013.
- BRAVIM, F. et al. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **J Ind Microciol Biotechnol**, v. 37, n. 10, p. 1071–9, 2010.
- BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure activates transcription factors involved in *Saccharomyces cerevisiae* stress tolerance. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 15, p. 2712–20, 2012.
- BREWSTER, J. et al. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, v. 259, p. 1760–1763, 1993.
- ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 569–578, 2005.
- CANETTA, E.; WALKER, G. M.; ADYA, A. K. Nanoscopic morphological changes in yeast cell surfaces caused by oxidative stress: An atomic force microscopic study. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 547–555, 2009.
- CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 6, p. 450–457, 2001.
- CAUSTON, H. C. et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 2, p. 323–37, 2001.
- CHANT, J. Cell polarity in yeast. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 365–91, 1999.
- CULLUM, A. J.; BENNETT, A. F.; LENSKI, R. E. Evolutionary adaptation to temperature. IX. Preadaptation to novel stressful environments of *Escherichia coli* adapted to high temperature. **Evolution**, v. 55, p. 2194–2202, 2001.
- ESTRUCH, F.; CARLSON, M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 3872–3881, 2001.

F SHERMAN. Getting with Yeast. In: GIETZ, R. D.; WOODA, R. A. (Eds.). . **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Science, 2002.

FELDMANN, H. **Yeast Molecular and Cell Biology**. 2nd. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2012.

FERNANDES, P. M. B. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FERNANDES, P. M. B.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett Appl Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 42–6, 2001.

FERREZUELO, F. et al. The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. **Nature communications**, v. 3, p. 1012, 2012.

GASH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol Biol Cell**, v. 11, p. 4241–4257, 2000.

GASH, A. P. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Eds.). . **Yeast Stress Response**. 2 nd ed. Alemanha: Springer, 2003. p. 11–57.

GIETZ, R. D.; WOODA, R. A. *Methods in Enzymology*. **Elsevier Science**, v. 350, 2002.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546–549, 1996.

GREENACRE, E. J.; BROCKLEHURST, T. F. The Acetic Acid Tolerance Response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 62–65, 2006.

GUTIN, J. et al. Condition-specific genetic interaction maps reveal crosstalk between the cAMP/PKA and the HOG MAPK pathways in the activation of the general stress response. **Mol Syst Biol**, v. 11, p. 829, 2015.

HEGGART, H. M. et al. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. **MBAA TQ**, v. 33, p. 383–406, 1999.

HERSEN, P. et al. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. **PROC NAT ACAD SCI**, v. 105, p. 7165–7170, 2008.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 66, n. 2, p. 300–372, 2002.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast Stress Response**. 2 nd ed. Alemanha: [s.n.].

HU, X. H. et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, p. 14791487, 2007.

KARREMAN, R. J.; LINDSEY, G. G. A rapid method to determine the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12:green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter. **J Biomol Screen**, v. 10, n. 3, p. 253–259, 2005.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends Plant Sci**, v. 6, n. 6, p. 262–7, 2001.

KOBAYASHI, N.; MCENTEE, K. Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 17, p. 6550–4, 1990.

KOBAYASHI, N.; MCENTEE, K. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 1, p. 248–56, 1993.

KREGER-VAN, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.). **The yeasts**. 2 ed ed. IONDON: Academic Press, 1987. p. 5–61.

KURTZ, S. et al. An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 231, n. 4742, p. 1154–7, 1986.

LEE, J. et al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **J Biol Chem**, v. 181, p. 16040–16046, 1999.

LEE, P. H.; LEE, D. Modularized learning of genetic interaction networks from biological annotations and mRNA expression data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 11, p. 2739–47, 2005.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos - Vol 3**. RJ: EdgardBlucher, 2001.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu Rec Genet**, v. 22, p. 631–677, 1988.

MARTINEZ-PASTOR, M. T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **Embo J**, v. 15, p. 2227–2235, 1996.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 294–298, 1989.

MITCHELL, L. et al. Functional dissection of the NuA4 histone acetyltransferase reveals its role as a genetic hub and that Eaf1 is essential for complex integrity. **Mol Cell Biol**, v. 28, p. 2244–2256, 2008.

MORGAN, B. et al. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Embo J**, v. 16, p. 1035–1044, 1997.

MOTSHWENE, P. et al. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical journal**, v. 377, n. Pt 3, p. 769–74, 2004.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

NICOLAU, A.; TORTOI, M. Factori care favorizează dezvoltarea microorganismelor. In: **Microbiologie generala**. [s.l.] Editura Academica, 2006. p. 107–118.

OSUMI, M. Visualization of yeast cells by electron microscopy. **Journal of Electron Microscopy**, v. 61, n. 6, p. 343–365, 2012.

PALHANO, F. L. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 50, n. 4, p. 447–57, 2004.

PETELLENZ-KURDZIEL, E. et al. Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, p. 1120–6, 2011.

PIPER, P. W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiol Lett**, v. 134, p. 121–127, 1995.

PRATT, P. L.; BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. The effects of Osmotic Pressure and Ethanol on Yeast Viability and Morphology. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, p. 179–296, 2003.

RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; PRIETO, J. A. Engineering baker's yeast: room for improvement. **Trends Biotechnol**, v. 17, n. 6, p. 237–44, 1999.

REP, M. Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 5474–5485, 1999.

REP, M. et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity. **J. Biol**, v. 275, p. 8290–8300, 2000.

SADEH, A. et al. Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners. **Mol Biol Cell**, v. 22, p. 3127–3138, 2011.

SALES, K. et al. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1463, n. 2, p. 267–278, 2000.

SCHMITT, A.; MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *S. cerevisiae*. **PROC NAT ACAD SCI**, v. 93, p. 5777–5782, 1996.

SIDERIUS, M.; ROTS, E.; MAGER, W. H. High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. **Microbiology**, v. 143, p. 3241–3250, 1997.

SMART, K. Brewing Yeast Oxidative Stress Responses: Impact of Brewery Handling. In: **Brewing Yeast Fermentation Performance**. 2 nd ed. [s.l.] Blackwell Science Ltd., 2008.

SMART, K. A. Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. **Yeast**, v. 24, p. 993–1013, 2007.

SOTO, T. et al. Accumulation of trehalose by overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Appl Environ Microb**, v. 65, p. 2020–2024, 1999.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010.

TAGKOPOULOS, I.; LIU, Y. C.; TAVAZOIE, S. Predictive Behavior Within Microbial Genetic Networks. **Science**, v. 320, p. 1313–1317, 2008.

TAKEUCHI, T. et al. Mutational analysis of Yap1 protein, an AP-1-like transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 416, n. 3, p. 339–43, 1997.

TALIA, S. DI et al. The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. **Nature**, v. 488, p. 947–51, 2007.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**, v. 15, p. 319–326, 2005.

TEUSINK, B. et al. The danger of metabolic pathways with turbo design. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 5, p. 162–169, 1998.

TOLEDANO, M. B. et al. Oxidative stress responses in yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Eds.). . **Yeast Stress Response**. [s.l.] Springer, 2003. p. 241–284.

TREVISOL, E. T. V et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 697–704, 2011.

TROTT, A.; MORANO, K. A. The yeast response to heat shock. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Eds.). . **Yeast Stress Response**. [s.l.] Springer, 2003. p. 71–109.

VAN VOORST, F. et al. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast**, v. 23, n. 5, p. 351–359, 2006.

VARELA, J. C. S. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by the protein kinase A. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 6232–6245, 1995.

WALKER, G. M. Yeast Metabolism. In: WALKER, G. M. (Ed.). . **Yeast Physiology and Biotechnhnology**. Chinchester: Wiley, 1998. p. 203–264.

WELKER, S. et al. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. **Molecular Cell**, v. 39, n. 4, p. 507–520, 2010.

ZHAO, Q. **The HOG MAPK and Yeast Stress Responses: Roles in Oxidative Stress and Heat Shock**. [s.l.] Rice University, 2001.

